



# UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

## HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

### Analyse, fonction et diversité des génomes viraux des plantes et élaboration de stratégies de lutte.

Soutenue publiquement le 4 juillet 2008

par Pierre-Yves Teycheney

#### Composition du jury

**Amadou Bâ**, Professeur à l'Université des Antilles et de la Guyane, rapporteur

**Olivier Gros**, Maître de Conférence à l'Université des Antilles et de la Guyane, examinateur

**Thierry Lefrançois**, Chercheur au CIRAD Antilles-Guyane, examinateur

**Olivier Le Gall**, Directeur de Recherche à l'INRA, rapporteur

**Mark Tepfer**, Directeur de Recherche à l'INRA, rapporteur

*« Qu'est ce qu'un homme révolté ? Un homme qui dit non. Mais s'il refuse, il ne renonce pas : c'est aussi un homme qui dit oui, dès son premier mouvement ».*

*Albert Camus, « L'homme révolté »*

## Exercice de mémoire

Ce mémoire donne un aperçu de ce que j'ai fait d'une part importante de mon existence au cours de ces vingt dernières années. Il ne dit rien des rencontres, des amitiés ni des inimitiés qui ont profondément influencé ce que je persiste à ne pas considérer comme une carrière mais comme un exercice privilégié de la curiosité. Il ne serait donc pas complet sans un hommage sincère aux actrices et acteurs de mon aventure scientifique, qui s'est fort heureusement doublée d'une aventure humaine placée sous le signe de la chance. En effet, dans tous les laboratoires que j'ai écumés au cours de ma vie d'intermittent de la science, de pays en pays, j'ai côtoyé des gens talentueux et passionnés, d'autres moins. Tous ont apporté leur pierre à l'édifice.

Les liens tissés durant les années héroïques de mon DEA et de ma thèse ont la peau dure. Les habitants habités du laboratoire de virologie du centre INRA de Bordeaux de l'époque m'ont accompagnés pendant mes années d'apprentissage, école de rigueur et de passion, et bien au-delà. L'amitié de certain(e)s ne s'est jamais démentie et m'a, en des circonstances difficiles, plus d'une fois aidé à tenir le cap. Qu'elles et ils en soient toutes et tous remercié(e)s. A tort ou à raison, j'ai toujours considéré ce laboratoire comme ma famille scientifique et certains de ses membres comme ma famille tout court. Continuer aujourd'hui à collaborer avec Thierry Candresse et certains des membres de cette équipe revêt donc pour moi un sens profondément humain, qui s'ajoute à l'intérêt scientifique et intellectuel de poursuivre des objectifs convergents.

Mes années australiennes ont été une bénédiction dont j'ai eu le plus grand mal à me remettre. Tant de ciel, de mer et d'ocres, et la lumière impitoyable découpant de sa lame acérée le contour des hommes et des choses. Temps béni et insouciant, partagé à parts égales entre la science et le sport, nostalgie à perpétuité d'un lointain tropique.

Le choc thermique et culturel que constitue mon séjour batave n'en fut que plus rude, bien aidé en cela par le plus somptueux des ratages scientifiques qu'il m'ait été donné de vivre. Une belle leçon d'humilité, atténuée par la rencontre du Pr John Bol, dont la gentillesse n'a d'égal que la timidité, le talent et la ténacité.

Puis vinrent mes années versaillaises qui, à défaut d'être royales, n'en furent pas moins fécondes. Là encore, le hasard ou le destin m'a conduit jusqu'à Mark Tepfer, dont j'admire l'intelligence et l'imagination. Je crois pouvoir dire sans me tromper que nous nous sommes bien amusés, et que nous avons fait ensemble du bon boulot. Les liens tissés pendant ces trois années et demie sont robustes eux aussi, et ils résistent remarquablement aux kilomètres d'eau salée qui nous séparent.

Et depuis 6 ans, un nouveau tropique. Dire que mon départ pour la Guadeloupe a été enthousiaste serait largement exagéré. Dire que je le regrette le serait tout autant. Je crois avoir trouvé au CIRAD un équilibre entre la recherche fondamentale et son application pour la résolution de certains des problèmes agronomiques très concrets qui touchent les plus pauvres. J'ai la chance de pouvoir concilier les deux, et j'espère la conserver car elle fait la force de notre institut. J'espère également pouvoir contribuer dans mon domaine à relever certains des défis scientifiques et sanitaires auxquels nous serons confrontés de façon croissante, en particulier ceux liés à l'émergence des maladies. J'ai également trouvé au CIRAD des gens passionnés et parfois même idéalistes. Certains sont devenus des amis, d'autres pas, mais c'est aux premiers que je veux dire combien je les estime.

Oui, les rencontres nous font, et il est des séparations qui nous défont. Je voudrais dédier ce mémoire à ma mère. Elle m'a appris à marcher et à lire, à aimer et à douter, à m'enthousiasmer et à m'insurger. Elle m'a également appris à ne pas croire n'importe quoi. Toutes qualités utiles à un chercheur, et dont l'usage quotidien est, je crois, le plus bel hommage que je puisse lui rendre.



## Sommaire

<b>1. Curriculum vitae</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Etat civil et parcours scientifique</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Liste des publications et communications</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1. Publications scientifiques</b>	<b>4</b>
1.2.1.1. Publications dans des revues à comité de lecture	4
1.2.1.2. Chapitres d'ouvrages	5
1.2.1.3. Publications dans des revues sans comité de lecture	5
1.2.1.4. Actes de congrès	6
<b>1.2.2. Communications dans des congrès</b>	<b>6</b>
1.2.2.1. Communications orales	6
1.2.2.2. Communications par voie d'affiches	10
<b>1.2.3. Séminaires sur invitation</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Activités d'enseignements et d'encadrement</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1. Activités d'enseignement</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2. Encadrement d'étudiants de 3<sup>e</sup> cycle et de post-doctorants</b>	<b>13</b>
<b>1.3.3. Encadrement d'étudiants de 2<sup>e</sup> cycle</b>	<b>13</b>
<b>1.3.4. Encadrement de chercheurs</b>	<b>14</b>
<b>1.3.5. Encadrement de personnel permanent</b>	<b>14</b>
<b>1.4. Administration de la recherche</b>	<b>14</b>
<b>1.4.1. Coordination de projets</b>	<b>14</b>
<b>1.4.2. Responsabilités diverses</b>	<b>14</b>
<b>2. Synthèse des travaux scientifiques</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Analyse, fonctionnement et diversité des génomes viraux</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1. Le modèle <i>Potyvirus</i></b>	<b>17</b>
2.1.1.1. Séquence et organisation génétique du génome du PPV	17
2.1.1.2. Séquence, organisation et diversité moléculaire du PStV	18
<b>2.1.2. Le modèle <i>Alfamovirus</i></b>	<b>19</b>
<b>2.1.3. Le modèle <i>Flexivirus</i></b>	<b>21</b>
<b>2.2. Mise au point de stratégies de lutte antivirale</b>	<b>23</b>
<b>2.2.1. Mise au point d'outils moléculaires de diagnostic</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2. Obtention de plantes transgéniques exprimant des parties de génomes viraux</b>	<b>24</b>
2.2.2.1. Obtention de lignées de tabac transgéniques exprimant des parties du génome du PPV	24
2.2.2.2. Obtention de lignées d'arachides transgéniques exprimant le gène codant pour la protéine de capsid du PStV	26
2.2.2.3. Obtention de lignées de tabac transgéniques exprimant le gène codant pour la protéine de capsid du CMV ou du LMV	27

<b>2.3. Biosécurité des plantes transgéniques exprimant des séquences virales et stabilité des phénotypes modifiés par transgénèse</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1. Limitation des risques potentiels liés à l'utilisation de plantes transgéniques exprimant des séquences virales</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2. Evaluation des risques de modification du phénotype de plantes transgéniques résultant d'infections par des virus supprimeurs du <i>silencing</i></b>	<b>30</b>
<b>2.4. Pararetrovirus endogènes</b>	<b>32</b>
<b>3. Projet scientifique</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Diversité et structure des populations virales des bananiers et plantains : impact sur le fonctionnement des génomes viraux et l'émergence de maladies</b>	<b>37</b>
<b>3.1.1. Situation du sujet</b>	<b>37</b>
<b>3.1.2. Objectifs du projet</b>	<b>38</b>
<b>3.1.3. Démarche</b>	<b>39</b>
3.1.3.1. Diversité des espèces BSV	39
3.1.3.2. Impact de la diversité moléculaire sur le fonctionnement des génomes viraux	40
3.1.3.3. Caractérisation des populations virales des bananiers et plantains	41
<b>3.2. Evaluation et gestion du risque lié à l'activation des EPRV BSV pathogènes</b>	<b>42</b>
<b>3.2.1. Situation du sujet</b>	<b>42</b>
<b>3.2.2. Objectifs du projet</b>	<b>44</b>
<b>3.2.3. Démarche</b>	<b>44</b>
3.2.3.1. Recherche et caractérisation de gènes de plantes impliquées dans l'activation des EPRV BSV pathogènes	44
3.2.3.2. Evaluation du risque de dissémination des espèces BSV par la diffusion à grande échelle d'hybrides interspécifiques porteurs d'EPRV BSV pathogènes	45
3.2.3.3. Recherche et caractérisation de sources naturelles de résistances à l'expression des EPRV BSV pathogènes	47
3.2.3.4. Création de ressources génétiques <i>M. balbisiana</i> ne posant pas de risques d'activation d'EPRV BSV	48
<b>4. Références bibliographiques</b>	<b>49</b>

## 1- Curriculum vitae

### 1.1. Etat civil et parcours scientifique

**Pierre-Yves Teycheney**  
Né le 13 mai 1965 à Bordeaux  
Célibataire

Adresse professionnelle:  
CIRAD-UPR75  
Station de Neufchâteau  
Sainte Marie  
97130 Capesterre Belle-Eau

Tel : 05 90 86 17 71  
Fax : 05 90 86 80 77  
email : teycheney@cirad.fr

### TITRES UNIVERSITAIRES ET PARCOURS SCIENTIFIQUE

---

**Depuis 2001 : chercheur au CIRAD** au poste de virologue du programme Banane-Plantain-Ananas puis de l'UPR75, affecté à la station de Neufchâteau (Guadeloupe).

**1998-2001 : Chercheur contractuel** au laboratoire de biologie cellulaire du centre INRA de Versailles, équipe du Dr M. Tepfer. Financement de la société Altadis.

**1995 -1997: Stage post-doctoral**, laboratoire du Pr J. Bol, Rijksuniversiteit Leiden (Pays Bas). Bourse de l'Union Européenne, *Human Capital and Mobility Program*.

**1992-1995 : Research associate** au *Queensland Agricultural Biotechnology Centre* de Brisbane (Australie), laboratoire du Dr RG Dietzgen. Programme financé par l'*Australian Centre for International Agricultural Research* (ACIAR).

**1992 : Doctorat de l'Université de Bordeaux II**, soutenu le 19 février 1992. Directeur de thèse : Pr JM Bové.

**1988 : DEA biologie-santé**, option pathologie microbienne et virale, Université de Bordeaux II.

**1987 : Maîtrise de biologie cellulaire et physiologie**, option génétique, Université de Bordeaux II.

**1986 : Licence de biochimie**, Université de Bordeaux II.

**1985 : Diplôme d'Etudes Universitaires Générales**, série "sciences de la nature et de la vie", Université de Bordeaux I.

**1983 : Baccalauréat** série D

## 1.2. Liste des publications et communications

### 1.2.1. Publications scientifiques

#### 1.2.1.1. Publications dans des revues à comité de lecture

1. **Teycheney P.Y.**, Tavert G., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez J. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucl. Acid Res.* **17**: 10115-10116.
2. Wetzel T., Tavert G., **Teycheney P.Y.**, Ravelonandro M., Candresse T., Dunez J. (1990). Dot hybridization detection of plum pox virus using 32P-labeled RNA probes representing non-structural viral protein genes. *J. Virol. Meth.***30**: 161-172.
3. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R. P., Dunez J. (1992). Construction of a chimaeric viral gene expressing plum pox virus coat protein. *Gene* **120**: 167-173.
4. **Teycheney P.Y.**, Dietzgen R. G. (1994). Cloning and sequence analysis of the coat protein gene of an Australian strain of peanut mottle and an Indonesian "blotch" strain of peanut stripe potyviruses. *Virus Res.* **31**: 235-244.
5. Dietzgen R.G., Xu Z., **Teycheney P.Y.** (1994). Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease* **78**: 708-711.
6. Higgins C.M., Cassidy B.G., **Teycheney P.-Y.**, Wongkaew S., Dietzgen R.G. (1998). Sequences of the coat protein gene of five peanut stripe virus (PStV) strains from Thailand and their evolutionary relationship with other bean common mosaic virus sequences. *Arch. Virol* **143**: 1655-1667.
7. **Teycheney P.-Y.**, Aaziz R., Dinant S., Salánki K., Tourneur C., Balázs E., Jacquemond M., Tepfer M. (2000). Synthesis of (-)-strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *J. Gen. Virol.* **81**: 1121-1126.
8. Berthomé R., **Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (2000a). Mécanismes de résistance aux virus dans les plantes transgéniques. *Virologie* **4**: 49-60.
9. Berthomé R., **Teycheney P.-Y.**, Renou J.P., Okada Y., Tepfer, M. (2000b). Expression of a yeast RNase III gene in transgenic tobacco silences host nitrite reductase. *Plant Molecular Biology* **44**: 53-60.
10. **Teycheney P.Y.**, Tepfer, M. (2001). Virus-specific spatial differences in the interference with *chs-A* gene silencing in non-transgenic Petunia. *J. Gen. Virol.* **82**: 1239-1243.
11. Jacquemond M, **Teycheney P.-Y.**, Carrère I., Navas-Castillo J., Anselem J., Tepfer, M. (2001). Resistance phenotypes of transgenic tobacco plants expressing different cucumber mosaic virus (CMV) coat protein genes. *Mol. Breeding* **8**: 85-94.
12. **Teycheney, P.-Y.**, Tepfer, M. (2002). Interactions spatiales entre infection virale et extinction post-transcriptionnelle chez le pétunia. *Virologie* **6**: 303-304.
13. Iskra-Caruana M.-L., Lheureux F., **Teycheney, P.-Y.** (2003). Les Pararetrovirus endogènes (EPRV), voie nouvelle de transmission des virus de plantes. *Virologie* **7**: 255-265.
14. **Teycheney P.-Y.**, Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse, T. (2005a). Molecular characterization of banana virus X (BVX), a novel member of the *Flexiviridae*. *Arch. Virol.* **150**: 1715-1727.



15. **Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., Candresse, T. (2005b). High genetic variability and evidence for plant-to-plant transfer of Banana Mild Mosaic Virus. *J. Gen. Virol.* **86**: 3179-3187.
16. Le Provost G., Iskra-Caruana M.-L., Acina I., **Teycheney, P.-Y.** (2006). Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. *J. Virol. Meth.* **137**: 7-13.
17. **Teycheney P.-Y.**, Acina I., Lockhart B. E. L., Candresse T. (2007). Detection of *Banana mild mosaic virus* and *Banana virus X* by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR). *J. Virol. Meth.* **142**: 41-49.
18. **Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (2007). Possible roles of endogenous plant viral sequences and transgenes containing viral sequences in both virus resistance and virus emergence. *Environ. Biosafety Res.* **6**: 19-21.

#### 1.2.1.2. Chapitres d'ouvrages

1. **Teycheney, P.-Y.** (2000). Les viroses végétales. *Encyclopaedia Universalis*.
2. Iskra-Caruana M.-L., **Teycheney P.-Y.** (2002). Bananier: la menace fantôme. *La science au présent, Encyclopaedia Universalis*, pp 83.
3. Hohn T., Richert-Pöggeler K., Staginnus C., Harper G., Schwartzacher T., Teo C.-H., **Teycheney P.-Y.**, Iskra-Caruana ML, Hull R. (2008). Evolution of integrated plant viruses. In *Plant virus evolution*, M. Roossinck ed., Springer.
4. **Teycheney P.-Y.** (sous presse) Maladies virales des bananiers et plantains. In *Bananiers et plantains*, T. Lescot ed., Editions Quae.

#### 1.2.1.3. Publications dans des revues sans comité de lecture

1. Ravelonandro M., **Teycheney P.Y.**, Taver G., Wetzel T., Monsion M., Delbos R.P., Dunez J. (1990). Genomic organization of plum pox virus and recombinant DNA technology to combat plum pox virus. *Acta Horticulturae* **283**: 295-304.
2. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Dunez J. (1992). Transgenic tobacco plants that contain the plum pox virus (PPV) coat protein. *Acta Horticulturae* **309**: 191-196.
3. Dietzgen R.G., **Teycheney P.Y.**, Birch R.G., Livingstone M., Budiarto (1993). Molecular cloning of peanut stripe potyvirus coat protein gene and progress in marker gene transfer and peanut regeneration. *ACIAR food legume newsletter* **18**: 11-12.
4. **Teycheney P.-Y.** (1999). Plantes et virus : la guerre sans fin. *Biofutur* **189**: 30-33.
5. **Teycheney P.-Y.** (2000). Le tabac comme modèle d'étude des interactions plantes/virus. *Bull. ARN* : 17-26.
6. **Teycheney P.-Y.**, Caruana, M.-L. (2002). Bananier : l'ennemi intérieur. *La recherche* **353**: 34-38.
7. Péréfarres F., Le Provost G., Acina I., Lockhart BEL, Iskra-Caruana ML, Candresse T., **Teycheney P.-Y.** (2008). Detection, prevalence and diversity of *Banana streak viruses* (BSV), *Banana mild mosaic virus* (BanMV) and *Banana virus X* (BVX) in Guadeloupe. *Acta horticulturae* (sous presse).

## 1.2.1.4. Actes de congrès

1. Dietzgen RG, **Teycheney P.-Y.**, Livingstone M, Birch RG (1996). Current research on improved molecular diagnosis and control of groundnut viruses. In: Groundnut viral diseases in the Asia-Pacific region : summary and recommendations of the 4<sup>th</sup> meeting of the international working group, 12-14 mars 1995, Khon Kaen University, Thaïlande. DVR Reddy and CLL Gowda eds, ICRISAT, pp 15-16.
2. Higgins CM, **Teycheney P.-Y.**, Karunaratne S, Basnayake S, Newton T, Livingstone M., Birch RG, Dietzgen RG (1996). Evaluation of viral coat protein sequences to confer transgenic resistance to *Peanut stripe potyvirus*. *Proc. 3rd Asia Pacific conference on agricultural biotechnology : issues and choices*, Thaïlande, 10-15 novembre 1996. pp 23.
3. Dietzgen RG, **Teycheney P.-Y.** (1996). Pathogen-mediated resistance to plant viruses : strategies to control *Peanut stripe virus*. In: Current status of agricultural biotechnology in Indonesia. Proceedings of the second conference on agricultural biotechnology, Jakarta, Indonésie, 13-15 juin 1995, vol 1, pp 37-43.
4. Dietzgen R.G., Higgins C.M., Hall R.M., **Teycheney, P.-Y** (1998). Genetically-engineered resistance to *Peanut stripe potyvirus*. In: Larkin, PJ (ed.) *Agricultural biotechnology : laboratory, field and market*. Proceedings of the 4<sup>th</sup> Asia-Pacific conference on agricultural biotechnology, Darwin, Australie, 13-16 juillet 1998. Canberra, UTC Publishing, pp 24-25.
5. **Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (1999). Gene flow from virus-resistant transgenic crops to wild relatives or to infecting viruses, Kew, Royaume-Uni. *Proceedings BCPC on gene flow and agriculture* **52**: 191-196.
6. **Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Zvanella-Dumas L., Galzi S., Foissac X., Côte F., Caruana M.-L (2002). Impact of viral diseases on micropropagation and diffusion of newly created banana varieties at CIRAD. *Proc. ACORBAT*, pp 212-215.
7. **Teycheney P.-Y.**, Folliot M., Galzi S., Le Provost G., Laboureau N., Caruana M.-L., Candresse T. et Côte F.-X. (2005). Viral diseases of plantains : constraints and prospects. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Symp. on plantain*, pp 209-213.
8. **Teycheney P.-Y.**, Folliot M., Galzi S., Laboureau N., CaruanaM.-L., Piffanelli P., Noa Carazzana J.-C., Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse T., Côte F.-X. (2005). Towards a better control of the viral constraints hampering the multiplication and exchange of *Musa* germplasm. *Proc. Caribbean Food Crops Society*. **41**: 92-93.
9. Vuillaume C., **Teycheney P.-Y.**, Dollet M., Daugrois J.-H., Pavis C., Palloix A., Urbino C., Lavigne C., Goguey T., Martinez D., Lefrançois T., Molia, S. (2005). Update on French Caribbean safeguarding invasive species CIRAD-INRA initiatives. *Proc. Caribbean Food Crops Society*. **41**: 86-91.
10. **Teycheney P.-Y.**, Le Provost, G. Laboureau N., Acina I., Péréfarres F., Caruana M.-L., Candresse, T. (2006). Improved detection of BSV and BVX, and study of their prevalence and molecular diversity in Guadeloupe. *Proc XVIIth International Acorbat meeting*, pp 774-780.

## 1.2.2. Communications dans des congrès

## 1.2.2.1. Communications orales

1. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Dunez J. (1989). Clonage du gène de la protéine capsidique du PPV-D et expression dans un système eucaryote. *2e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France*.
2. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Dunez J. (1989). Clonage du gène de la protéine capsidique du PPV dans un vecteur d'expression eucaryote et

- expression *in vitro*. 2e congrès de la Société Française de Microbiologie, Strasbourg, France.
3. Ravelonandro M., **Teycheney P.Y.**, Wetzel T., Tavert G., Delbos R.P., Dunez J. (1989). Characterisation of the genome of plum pox virus, strain D, an aphid transmissible virus. *4th International Plant-Virus Epidemiology Workshop, Montpellier, France*.
  4. **Teycheney P.Y.**, Monsion M., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez J. (1989). Obtention de plantes transgéniques exprimant la protéine capsidique du PPV. *3e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France*.
  5. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Dunez, J. (1991). Transgenic tobacco plants that contain the plum pox virus coat protein gene. *15th International Symposium on virus and virus diseases of temperate fruit crops, Vienne, Autriche*.
  6. Candresse T., Brault V., **Teycheney P.Y.**, Le Gall O., Ravelonandro M., Delbos R.P., Lanneau M., Dunez J. (1991). Use of pathogen-derived resistance to obtain plants resistant to nepo- and potyviruses. *UCLA symposium on Crop improvement, Keystone, Etats-Unis*.
  7. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Dunez J. (1991). Plum pox coat protein-mediated resistance in transgenic tobaccos. *5th International Plant Virus Epidemiology Symposium, Bari, Italie*.
  8. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Bachelier J.C., Dunez J. (1993). Use of PPV RNA sequences for plant protection. *Israeli-French binational symposium of plant virology, Paris, France*.
  9. **Teycheney P.Y.**, Livingstone M., Birch R.G., Dietzgen R.G. (1993). Development of novel genes and a groundnut transformation system for peanut stripe virus resistance, *ICRISAT-Scottish Crop Research Institute joint Meeting of International Working Groups on groundnut virus diseases, Dundee, Ecosse*.
  10. **Teycheney P.Y.**, Xu Z., Dietzgen R.G. (1993). Nonradioactive detection of peanut mottle and peanut stripe viruses with cRNA probes transcribed from cloned 3' regions of the viral genomes. *ICRISAT-Scottish Crop Research Institute joint Meeting of International Working Groups on groundnut virus diseases, Dundee, Ecosse*.
  11. Ravelonandro M., **Teycheney P.Y.**, Monsion M. Delbos R.P., Bachelier J.C., Dunez J. (1993). Genetically engineered resistance against plum pox virus. *Symposium "from the coat protein protection to rampant designed infection : the exploitation of plant viruses in biotechnology", Dundee, Ecosse*.
  12. Dietzgen R.G., Birch R.G., Livingstone M., **Teycheney P.Y.** (1994). Genetic transformation of peanut. *1st Australian peanut conference, Gladstone, Australie*.
  13. Dietzgen R.G., **Teycheney P.Y.**, Livingstone M., Birch R. G. (1995). Groundnut virus diseases in the Asia-Pacific region. *ICRISAT working meeting, Khon Khaen, Thaïlande*.
  14. Dietzgen R.G., **Teycheney P.Y.** (1995). Pathogen-mediated resistance to plant viruses : strategies to control peanut stripe disease. *2nd conference on agricultural biotechnology, Djakarta, Indonésie*.
  15. Dietzgen R.G., **Teycheney P.Y.**, Livingstone M., Birch R.G. (1995). Coat protein-mediated protection against PSTv. *5th International congress on the impact of viral diseases in the developing world, Johannesburg, Afrique du Sud*.
  16. Higgins C.M., **Teycheney P.Y.**, Karunaratne S., Basnayake S., Newton T., Livingstone L., Birch R., Dietzgen R.G. (1995). Use of viral coat protein genes to confer transgenic resistance to peanut stripe virus, *Joint conference of the Australian Society of Biotechnology and Molecular Biology and the Australian Society of Plant Physiology, Canberra, Australie*.

17. Higgins C.M., **Teycheney P.Y.**, Karunaratne S., Basnayake S., Newton T., Livingstone M., Birch R.G., Dietzgen R.G. (1995). Evaluation of viral coat protein sequences to confer transgenic resistance to peanut stripe potyvirus. *3rd Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology: Issues and Choices, Bangkok, Thaïlande.*
18. Higgins C.M., **Teycheney P.Y.**, Cassidy B., Wongkaew S., Dietzgen R.G. (1995). Sequence variability of peanut stripe virus in Thailand. *3rd Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology: Issues and Choices, Bangkok, Thaïlande.*
19. Dietzgen R.G., Livingstone D.M., Higgins C.M., Hall R.M., Karunaratne S., Newton T., **Teycheney P.Y.**, Birch R.G. (1998). *Transformation of peanut varieties for virus resistance. 4th Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Darwin, Australie.*
20. Higgins C.M., Hall R.M., Karunaratne S., Livingstone D.M., LaBrie P.O., Newton T., **Teycheney P.-Y.**, Birch R.G., Dietzgen R.G. (1998). Minor viral coat protein gene modifications have major effects on transgenic resistance. *ASBMB/ASPP Combined Conference, Adelaide, Australie.*
21. Berthomé R., **Teycheney P.-Y.**, Vaucheret H., Renou J.P., Tepfer M. (1999). Interaction entre l'extinction post-transcriptionnelle de gènes et une endoribonucléase spécifique des ARN doubles brins de *Schizosaccharomyces pombe*. *7e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France.*
22. Dietzgen R.G., Higgins C.M., Hall R.M., **Teycheney P.-Y.** (1999). Genetically-engineered resistance to peanut stripe potyvirus. 12th Biennial Conference of the Australasian Plant Pathology Society «Asia-Pacific Plant Pathology for the New Millennium», Canberra, Australie.
23. **Teycheney P.Y.**, Berthomé R., Vaucheret H., Renou J.P., Tepfer M. (1999). Interaction between a dsRNA-specific RNase and post-transcriptional gene silencing. *11th International Congress of Virology, Sydney, Australie.*
24. **Teycheney P.Y.** (1999). Tabac et virus : une guerre sans fin. *XII<sup>e</sup> journées scientifiques de l'Association de Recherche sur les Nicotianées, Paris, France.*
25. **Teycheney P.-Y.**, Berthomé R., Renou J.P., Okada Y., Tepfer, M. Homology-independent post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. (2000). *EMBO workshop on plant virus invasion and host defence. Kolymbari, Grèce.*
26. **Teycheney P.-Y.**, Aaziz R., Salánki K., Balázs E., Jacquemond M., Tepfer M. (2000). Potential risks associated with recombination in transgenic plants expressing cucumber mosaic virus sequences. *6th International Symposium on the biosafety of genetically modified organisms, Saskatoon Canada.*
27. Gaubert S., Aaziz R., Belin C., De Wispelaere M., Fernandez I., **Teycheney P.-Y.**, Trouilloud S., Tepfer M. (2001). Cartographie des sites de recombinaison des ARN3 de deux cucumovirus. *8e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France.*
28. **Teycheney P.-Y.**, Tepfer, M. (2001). Viral interference with gene silencing in non-transgenic *Petunia*. *ESF workshop on the biosafety of virus-resistant transgenic plants, Versailles, France.*
29. Gaubert S., Aaziz R., Belin C., Trouilloud S., De Wispelaere M., **Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (2001). Mapping the sites of recombination on RNA3 of two cucumoviruses in doubly-infected plants. *ESF workshop on the biosafety of virus-resistant transgenic plants, Versailles, France.*
30. Tepfer M., Gaubert S., Belin C., de Wispelaere M., Fernandez I., Trouilloud S., **Teycheney P.-Y.** (2001). Assessment of potential ecological risks associated with recombination in transgenic virus-resistant plants. *10th European Congress on Biotechnology, Madrid, Espagne.*
31. **Teycheney P.-Y.**, Gaubert S., Balazs E., Tepfer, M. (2001). Viral interference with gene silencing in non-transgenic or transgenic plants. *ESF workshop on the assessment of the impacts of genetically modified plants : genetic interactions, Lisbonne, Portugal.*

32. **Teycheney P.-Y.**, Muller E., Seal S., Kenyon L., Harper G., Caruana M.-L. Genetic diversity of badnaviruses and its impact on germplasm movement. (2002). *12th International Congress of Virology, Paris, France.*
33. **Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Zvanella-Dumas L., Galzi S., Foissac X., Côte F., Caruana, M.-L. (2002). Impact of viral diseases on micropropagation and diffusion of newly created banana varieties at CIRAD. *15th Acorbat 2002, Carthagène, Colombie.*
34. **Teycheney P.-Y.**, Iskra-Caruana M.-L., Laboureau N., Carreel F., Candresse T. (2003). Molecular variability of *Banana mild mosaic virus*. *AAB meeting "Advances in plant virology", Montpellier, France.*
35. Dietzgen R. G., Mitter N., Higgins C. M., Hall R., **Teycheney P.-Y.**, Cruickshank R., Hapsoro D., Sudarsono. (2004). Harnessing RNA silencing to protect peanuts from stripe disease. *4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australie.*
36. **Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., Candresse T. (2004). Molecular variability of *Banana Mild Mosaic Virus*. *International Congress on Banana : harnessing research to improve livelihoods, Penang, Malaisie.*
37. **Teycheney P.-Y.**, Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse T. (2004). Molecular characterization of *Banana X virus*, a *Flexivirus* infecting banana. *International Congress on Banana : harnessing research to improve livelihoods, Penang, Malaisie.*
38. Folliot M., Galzi S., Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., **Teycheney P.-Y.**, Côte F.-X. (2004). Assessing the risks of spreading BSV through the diffusion of *Musa* germplasm after *in vitro* culture. *International Congress on Banana : harnessing research to improve livelihoods, Penang, Malaisie.*
39. Piffanelli P., NoaCarrazana J.-C., Benabdelmouna A., Matsumoto T., Silva-Rosales L., Lheureux F., **Teycheney P.-Y.**, Geering A. D., D'Hont A., Frison E., Roux N., Glaszmann J.-C., Sasaki T., Caruana M.-L. (2004). Molecular analysis of *Banana Streak Virus* (BSV) "integrants" into the nuclear genome of *Musa balbisiana*. *International Congress on Banana : harnessing research to improve livelihoods, Penang, Malaisie.*
40. **Teycheney P.-Y.**, Folliot M., Galzi S., Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., Piffanelli P., Noa Carazzana J.-C., Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse T., Côte F.-X. (2004).
41. Towards a better control of the viral constraints hampering the multiplication and exchange of *Musa* germplasm. *XVIth Acorbat meeting, Oaxaca, Mexique.*
42. Le Provost G., Caruana M.L., **Teycheney P.-Y.** (2005). Rôle de la méthylation dans l'expression des séquences EPRV-BSV pathogènes des bananiers. *10e rencontres de virologie végétale, Aussois, France.*
43. **Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., Candresse, T. (2005). Analyse de la variabilité génétique du virus de mosaïque atténuée du bananier (BanMMV). *10e rencontres de virologie végétale, Aussois, France.*
44. **Teycheney P.-Y.**, Folliot M., Galzi S., Laboureau N., Caruana M.-L., Piffanelli P., Noa Carazzana J.-C., Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse T., Côte F.-X. (2005). Towards a better control of the viral constraints hampering the multiplication and exchange of *Musa* germplasm. *41st annual congress of the Caribbean Food Crops Society, Gosier, Guadeloupe.*
45. **Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Iskra Caruana M.-L., Candresse T. (2005). High genetic variability in an RNA plant virus, Banana mild mosaic virus. *12th International congress of virology, San Francisco, Etats-Unis.*
46. Le Provost G., **Teycheney P.-Y.**, Dielen A.-S., Piffanelli P., Caruana M.-L. (2005). The role of methylation and chromosomal rearrangements involved in the expression of pathogenic *Banana streak virus* sequences integrated into the genome of banana. *12th International congress of virology, San Francisco, Etats-Unis.*

47. **Teycheney P.-Y.**, Marais A., Svanella-Dumas L. Candresse T. (2005). Banana virus X, a novel Flexivirus harbouring defective RNAs. *12th International congress of virology, San Francisco, Etats-Unis.*
48. **Teycheney P.-Y.**, Folliot M., Galzi S., Le Provost G., Laboureau N., Caruana M.-L., Candresse T., Côte F.-X. (2005). Viral diseases of plantains : constraints and prospects. *2<sup>nd</sup> international symposium on plantain, Manizales, Colombie.*
49. **Teycheney P.-Y.**, Le Provost G., Laboureau N., Acina I., Péréfarres F., Caruana M.-L., Candresse T. (2006). Improved detection of BSV and BVX, and study of their prevalence and molecular diversity in Guadeloupe. *XVIIth Acorbat meeting, Santa Catarina, Brésil.*
50. Péréfarres F., Acina I., **Teycheney P.-Y.** (2007). Prévalence et diversité du virus de la mosaïque en tirets du bananier (BSV) et du virus X du bananier (BVX) en Guadeloupe. *11e rencontres de virologie végétale, Aussois, France.*
51. Péréfarres F., Le Provost G., Acina I., Lockhart BEL, Dghim AA, Iskra-Caruana ML, Candresse T., **Teycheney P.-Y.** (2007). Detection, prevalence and diversity of *Banana streak viruses* (BSV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV) and *Banana virus X* (BVX) in Guadeloupe. *First ISHS/ProMusa symposium on recent advances in banana crop protection for sustainable production and improved livelihoods. White River, Afrique du Sud.*

#### 1.2.2.2. Communications par voie d'affiches

1. Tavert G., **Teycheney P.-Y.**, Wetzel T., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez J. (1989). Cloning and cartography of plum pox potyvirus genome. *4th meeting of the "Genetic, breeding and pomology of plum and prune" working group. Bordeaux, France.*
2. Tavert G., **Teycheney P.Y.**, Wetzel T., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez J. (1989). Clonage et cartographie du génome de la souche D de PPV. *2e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France.*
3. **Teycheney P.Y.**, Tavert G., Ravelonandro M., Delbos R.P., Dunez J. (1989). Séquence complète de l'ARN génomique du PPV-D. *2e forum des jeunes chercheurs en physiologie végétale, Strasbourg, France.*
4. **Teycheney P.Y.**, Tavert G., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez, J. (1989). Clonage et séquençage du génome du PPV-D. *2e congrès de la Société Française de Phytopathologie, Strasbourg, France.*
5. Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Dunez, J. (1989). Transgenic tobacco plants that contain the plum pox virus (PPV) coat protein gene. *3rd Congress of the International Society for Plant Molecular Biology, Tucson, Etats-Unis.*
6. Monsion M, Ravelonandro M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Callahan A., Cordt J., Scorza R., Gonsalves D., Dunez J. (1991). Transgenic plants that express the coat protein of plum pox potyvirus. *1<sup>st</sup> Thai-French symposium on plant gene regulation and expression, Bangkok, Thaïlande.*
7. Livingstone M., Birch R.G., **Teycheney P.Y.**, Dietzgen R.G. (1993). Towards coat protein gene mediated resistance to *Peanut stripe potyvirus* in transgenic peanut (*Arachis hypogaeae*). *9th International Congress of Virology, Glasgow, Ecosse.*
8. **Teycheney P.Y.**, Xu Z., Dietzgen, R.G. (1993). Comparative analysis of the 3' terminal nucleotide sequences of *Peanut stripe* and *Peanut mottle potyviruses*. *9th International Congress of Virology, Glasgow, Ecosse.*
9. Dietzgen R., Higgins C.M., Karunaratne S., Cassidy B., **Teycheney, P.Y.** (1997). Sequence variability of peanut stripe virus and transgenic resistance. *16th annual meeting of the American Society for Virology, Montana State University, Etats-Unis.*

10. Higgins C.M., Cassidy B., **Teycheney P.-Y.**, Karunaratne S., Dietzgen R.G. (1997). Is sequence variation within peanut stripe virus an issue for transgenic resistance? *5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore*.
11. Higgins CM, **Teycheney P.-Y.**, Karunaratne S., Dietzgen RG. (1997). Viral coat protein gene sequences confer transgenic resistance to Peanut stripe virus in *Nicotiana benthamiana*. *ISHS International symposium on biotechnology of tropical and subtropical species, Brisbane, Australie*.
12. **Teycheney P.-Y.**, Aaziz R., Dinant S., Jacquemond M., Tepfer, M. (1999). Reconnaissance par des réplicases virales hétérologues du site d'initiation de la réplication virale intégré dans des transcrits de transgènes. *7e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France*.
13. Dietzgen R.G., Higgins C.M., Hall R.M., LaBrie P., **Teycheney P.-Y.**, Birch R.G. (1999). Immunity to peanut stripe virus infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* and peanut. *11th International Congress of Virology, Sydney, Australie*.
14. **Teycheney P.-Y.**, Tepfer, M. (2001). Régulation spatiale de l'interférence avec l'extinction post-transcriptionnelle du gène chs-A et symptomatologie de pétunias non transgéniques infectés par le PVY, le TEV ou le CMV. *8e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France*.
15. **Teycheney P.-Y.**, Tourneur C., Tepfer, M. (2001). Plantes transgéniques sans marqueur de résistance à un antibiotique : l'exemple du tabac. *8e rencontres de virologie végétale CNRS-INRA, Aussois, France*.
16. **Teycheney P.-Y.**, Tepfer, M. (2001). Virus-specific differences in the interference with post-transcriptional silencing of the chs-A gene in non-transgenic petunias infected with PVY, CMV or TEV. *6th International Symposium on positive-strand RNA viruses, Paris, France*.
17. Gaubert S., Aaziz R., Belin C., Trouilloud S., de Wispelaere M., **Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (2001). Mapping the sites of recombination of two cucumoviruses in doubly-infected plants. *6th International Symposium on positive-strand RNA viruses, Paris, France*.
18. **Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Svanella-Dumas L., Iskra-Caruana M.-L., Foissac X., Candresse, T. (2003). Détection du virus de la mosaïque atténuée du bananier (BanMMV) par IC-RT-PCR et étude de sa variabilité moléculaire. *9<sup>e</sup> rencontres de virologie végétale, Aussois, France*.
19. Noa-Carrazana J.C., Vilarinhos A.D., Caruana M.-L., Lheureux F., **Teycheney P.-Y.**, Sabau X., Glaszmann J.-C., Dolezel J., Piffanelli, P. (2003). Integration patterns of *Banana streak virus* into banana nuclear genome. *7th International Congress on Plant Molecular Biology, Barcelone, Espagne*.
20. **Teycheney P.-Y.**, Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse T. (2005). Caractérisation moléculaire du *Banana Virus X* (BVX), un *Flexivirus* infectant le bananier. *10e rencontres de virologie végétale, Aussois, France*.
21. Folliot M., Galzi S., Laboureau N., Caruana M.-L., **Teycheney P.-Y.**, Côte F.-X. (2005). Evaluation du risque de propagation du *Banana Streak Virus* (BSV) par diffusion de germplasm *Musa* issu de culture in vitro. *10e rencontres de virologie végétale, Aussois, France*.
22. Piffanelli P., Noa-Carrazana J.-C., Lescot M., Benabdelmouna A., Doleze J., Matsumoto T., Silva-Rosales L., Lheureux F., **Teycheney P.-Y.**, Geering A.D., D'Hont A., Glaszmann J.-C., Sasaki T., Caruana M.-L. (2005). Molecular analysis of *Banana streak virus* (BSV) « integrants » into the nuclear genome of *Musa balbisiana*. *12th International congress of virology, San Francisco, Etats-Unis*.
23. Folliot M., Galzi M., Laboureau N., Caruana M.-L., **Teycheney P.-Y.**, Côte F.-X. (2005). Risk assessment of spreading *Banana streak virus* (BSV) through in vitro culture. *12th International congress of virology, San Francisco, Etats-Unis*.

24. **Teycheney P.-Y.**, Acina I., Lockhart B. E. L., Candresse T. (2007). Detection of *Banana mild mosaic virus* and *Banana virus X* by polyvalent degenerate oligonucleotide reverse transcription PCR (PDO-RT-PCR). *11e rencontres de virologie végétale, Aussois, France*.
25. Le Provost G., Lheureux F., Dielen A.-S., Laboureau N., **Teycheney P.-Y.**, Iskra-Caruana M.-L. (2007). Caractérisation, au cours de croisement génétiques, de l'expression de séquences pathogènes du *Banana streak virus* intégrées dans le génome du bananier. *11e rencontres de virologie végétale, Aussois, France*.
26. Le Provost G., Lheureux F., Dielen A.-S., Laboureau N., **Teycheney P.-Y.**, Iskra-Caruana M.-L. (2007). Characterization of the expression of pathogenic *Banana streak virus* sequences integrated in the genome of banana during genetic crosses. *First ISHS/ProMusa symposium on recent advances in banana crop protection for sustainable production and improved livelihoods. White River, Afrique du Sud*.
27. Noa-Carranza J.-C., Lescot M., Piffanelli P., Safar J., Dolezel J., Matsumoto T., Silva-Rosales L., Lheureux F., **Teycheney P.-Y.**, Sasaki T., Iskra-Caruana M.-L. (2007). Molecular analysis of *Banana streak virus* (BSV) in the nuclear genome of *Musa balbisiana*. *First ISHS/ProMusa symposium on recent advances in banana crop protection for sustainable production and improved livelihoods. White River, Afrique du Sud*.
28. Folliot M., Galzi M., Laboureau N., Caruana M.-L., **Teycheney P.-Y.**, Côte F.-X. (2007). Risk assessment of spreading *Banana streak virus* (BSV) through *in vitro* culture. *First ISHS/ProMusa symposium on recent advances in banana crop protection for sustainable production and improved livelihoods. White River, Afrique du Sud*.

### 1.2.3. Séminaires sur invitation

1. **Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (1998). Virus-resistant transgenic plants. University of Cape Town, Afrique du Sud.
2. **Teycheney P.-Y.**, Jacquemond M., Berthomé R., Tepfer M. (1999). Biosafety of virus resistant transgenic plants. University of Queensland, Australie.
3. **Teycheney P.-Y.** (2002). Contraintes virales liées au développement et à la diffusion de nouvelles variétés de bananier. Centre Africain de Recherche sur les Bananiers et Plantains (CARBAP), Njombe, Cameroun.
4. **Teycheney P.-Y.**, Marais A., Svanelle-Dumas L., Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., Candresse T. (2005). Molecular variability of *Banana Mild Mosaic Virus* (BanMMV) and characterization of a new *Flexivirus* infecting banana. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Irapuato, Mexique.
5. **Teycheney P.-Y.** (2006). Endogenous plant pararetroviruses : friend and foe. International Centre for Genetic Engineering and Biosafety (ICGEB), Ca' Tron di Roncade, Italie.
6. **Teycheney P.-Y.**, Folliot M., Galzi S., Le Provost G., Laboureau N., Caruana M.-L., Candresse T., Côte F.-X. (2006). Viral diseases of banana and plantain. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), Santo Domingo, République Dominicaine.



### 1.3. Activités d'enseignements et d'encadrement

#### 1.3.1. Activités d'enseignement

**1999-2000** : Cours de DEA BDAPC, Université Paris XI Orsay

**1999-2000** : Cours à l'Institut de Sciences et Technologie de l'Université Paris VI, spécialité industrie céréalière

**2000** : Cours de DEA Interactions Plantes-Microorganismes Université Paris XI / INA-PG

**2000** : Cours de DESS Economie et Agricultures Internationales, Paris XI Orsay

**2000-2001** : Cours à l'Ecole Nationale des Ingénieurs de l'Horticulture et du Paysage (ENIHP), l'Insitut National d'Horticulture, Angers

**2006** : Cours international et travaux pratiques à l'Université Nationale de Colombie : détection des virus de bananiers et plantains

**2008** : Cours international et travaux pratiques au CIRAD Guadeloupe : détection des virus de bananiers et plantains

#### 1.3.2. Encadrement d'étudiants de 3<sup>e</sup> cycle et de post-doctorants

**1998-1999** : Richard Berthomé, Thèse de Doctorat, Université Paris XI Orsay.  
*Evaluation de stratégies d'obtention de résistances aux virus: application au Pelargonium.*  
Participation à l'encadrement. Directeur de thèse : M. Tepfer.

**1999-2000** : Sandrine Maugendre, Diplôme Universitaire (DU), Université Paris VI Pierre et Marie Curie.  
*Obtention de lignées transgéniques de tabac exprimant des séquences virales, en l'absence de marqueur de sélection.*

**2004-2005** : Grégoire Le Provost, post doctorat (financé par la Commission Européenne).  
*Etude de l'expression de séquences pararétrovirales intégrées au génome de Musa balbisiana.*

**2006** : Frédéric Péréfarres, Master 2, Université d'Angers et Institut National d'Horticulture.  
*Etude de la prévalence et de la diversité des populations de virus de la mosaïque en tirets du bananier (BSV) et de virus X du bananier (BVX) en Guadeloupe.*

**2007** : Ata Allah Dghim, Diplôme d'Enseignement Supérieur et de Recherche (DESR), Université de Bourgogne.  
*Prévalence et diversité du virus de la mosaïque en tirets du bananier (BSV) et du virus X du bananier (BVX) en Guadeloupe.*

**2008-2010** : Elisa Javier-Higginson, Thèse de Doctorat, Université de La Havane (Cuba).  
Co-encadrement avec A.L. Etchemendia.  
*Diversité moléculaire des populations de virus de la mosaïque en tirets (BSV) à Cuba.*

#### 1.3.3. Encadement d'étudiants de 2<sup>e</sup> cycle

**1998** : Florence Audant, Stage de Licence, Université Paris VI Pierre et Marie Curie, 1 mois.  
*Biosécurité des plantes transgéniques exprimant des séquences virales.*

**1999** : Christophe Belin, Stage de Licence, ENS Lyon, 3 mois.  
*Recherche de génomes viraux recombinants résultant de co-infections par deux cucumovirus.*

**2008** : Rachel Rezé, Stage de DU, Université de Bourgogne, 6 mois.  
*Effets de la culture in vitro sur l'activation de séquences endogènes du virus de la mosaïque en tirets du bananier chez des variétés hybrides de bananier.*

### 1.3.4. Encadrement de chercheurs

**1992** : Dr Vilasini Pilai (Malaysian Agricultural Research and Development Institute, Malaisie).  
Diagnostic moléculaire du virus des tâches annulaires du papayer (PRSV), 3 mois.  
*Co-encadrement avec R.G. Dietzgen.*

**1993** : Pr Xu Zeyong (Oil Crops Research Institute, Chine).  
Mise au point de techniques de détection du virus des striures de l'arachide (PStV), 6 mois.

**1994** : Dr Sudarsono (Bogor Agricultural University, Indonésie).  
Transformation génétique de l'arachide, 6 mois.

**2003** : MSc Reina Teresa Martinez (IDIAF, République Dominicaine).  
Formation aux techniques d'indexation virologique, 2 semaines.

**2005** : MSc Marimuthu Somasundram Saraswathi (National Research Centre on Banana, Inde).  
Criblage des ressources génétiques Musa du NRCB pour la présence d'EPRV BSV, 6 semaines.  
*Co-encadrement avec F. Carreel.*

### 1.3.5. Encadrement de personnel permanent

**2002-2005** : Isabelle Acina (technicienne supérieure), encadrement à 50%.

**A partir de 2005** : Isabelle Acina (technicienne supérieure), encadrement à 100%.

## 1.4. Administration de la recherche

### 1.4.1. Coordination de projets

**2002-2005** : **Projet financé par la plateforme de génomique avancée de Montpellier-Agropolis** - *Structural and functional genomics of Banana streak virus sequences integration into the Musa genome*, regroupant 3 équipes de recherche.  
*Conjointement avec F.-X. Côte.*

**2002-2006** : **Projet financé par la Commission Européenne dans le cadre du 5<sup>e</sup> PCRD** - « Paradigm » (*Pararetroviruses : disease, integration and genomes*) regroupant 7 équipes de recherche et un partenaire industriel.  
*Conjointement avec M.-L. Caruana.*

**2007** : **Organisation d'un symposium international financé par la Commission Européenne dans le cadre du 6<sup>e</sup> PCRD** - *Balancing resistance and risk: plant endogenous viral sequences and virus-resistant transgenic plants as sources of both resistance and virus emergence*, Ca'Tron (Italie), 6-8 juin 2007.  
*Conjointement avec M. Tepfer.*

**2008-2013** : **Projet opérationnel financé par l'Union Européenne et la Région Guadeloupe (FEDER)** - *Gestion des risques en santé animale et végétale*.  
*Conjointement avec T. Lefrançois.*

### 1.4.2. Responsabilités diverses

Membre du comité de thèse de Loïc Emboulé (Université des Antilles et de la Guyane).

Membre du comité de programme du département BIOS du CIRAD.

## 2. Synthèse des travaux scientifiques

Les travaux de recherche décrits dans ce mémoire ont été réalisés entre 1987 et 2008. Ils ont porté sur l'analyse, la fonction et la diversité des génomes viraux chez les plantes à des fins de mise au point de stratégies de lutte anti-virale. Ils ont eu pour objets des virus appartenant à quatre grandes familles (*Potyviridae*, *Bromoviridae*, *Flexiviridae* et *Caulimoviridae*) dont les génomes ont des organisations et des stratégies d'expression différentes.

Dans le cadre de mes activités de recherche sur la fonction et la diversité des génomes viraux, j'ai déterminé la séquence nucléotidique totale ou partielle de l'ARN génomique de virus appartenant aux genres *Potyvirus* et *Flexivirus*, dans le but d'élucider l'organisation de leur génome et d'attribuer, sur la base d'homologies de séquences, des fonctions aux protéines correspondantes. Certaines de ces séquences ont été utilisées pour des études de diversité moléculaire visant pour leur part à mieux comprendre l'évolution des populations virales. Une partie de mes travaux de recherche a également porté sur la mise au point d'un système de réplication chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) d'un virus appartenant au genre *Bromovirus*, dans le but de caractériser les facteurs de l'hôte impliqués dans la réplication virale.

Dans le cadre de mes activités sur la mise au point de stratégies de lutte anti-virale, certaines des séquences nucléotidiques obtenues au cours de mes travaux ont servi à la mise au point d'outils de diagnostic : sondes nucléotidiques pour la détection par hybridation moléculaire, amorces oligonucléotidiques pour le diagnostic par des techniques immuno-moléculaires basées sur la PCR et mises au point ou optimisées afin de les rendre spécifiques, polyvalentes et utilisables pour le diagnostic de routine.

Une partie importante de mes recherches a porté sur la création de lignées transgéniques résistantes à certains des virus auxquels je me suis intéressé. Elles ont également porté sur l'étude des risques liés à l'utilisation des plantes transgéniques exprimant des séquences virales, en particulier les risques de recombinaison entre les transcrits des transgènes et le génome de virus hétérologues. Certains de mes travaux ont également concerné l'impact des infections virales sur la stabilité des modifications phénotypiques basées sur l'extinction post transcriptionnelle de gènes.

Un virus est un parasite obligatoire « acellulaire ayant un génome polynucléotidique qui code au moins pour une protéine impliquée dans sa réplication et qui, une fois dans la cellule hôte, peut induire sa propre multiplication » (Pierre Cornuet, in Astier *et al.*, 1997). La survie d'un virus dépend donc entièrement du métabolisme de son ou ses hôte(s) et de sa propre capacité à déjouer les mécanismes de défense mis en place par ce(s) dernier(s). Si l'on en juge par le « succès » des virus, qui ont colonisé l'ensemble des règnes du monde vivant, on peut estimer que leur capacité d'adaptation, et en particulier leur faculté de contourner ces mécanismes de résistance, est immense.

La survie de l'espèce humaine dépend pour sa part essentiellement du contrôle des maladies qui la menacent directement ou qui menacent ses ressources alimentaires, qu'elles soient d'origine animale ou végétale. Dans tous les cas, les maladies virales jouent un rôle important et leur contrôle fait depuis longtemps l'objet d'efforts de recherche dont la sophistication croît avec les progrès scientifiques et techniques. Dans le cas des plantes domestiquées puis cultivées, de longs efforts de sélection entrepris depuis l'invention même de l'agriculture ont abouti à des variétés améliorées résistantes ou tolérantes à certaines maladies virales. L'homme a également réussi, au moins ponctuellement, à contrôler la prolifération de certains virus en éliminant leurs vecteurs, comme certains insectes, champignons ou nématodes, sans trouver le moyen de guérir les infections virales, le recours aux molécules antivirales étant très récent et limité à quelques virus humains. Cependant, aujourd'hui comme hier, le diagnostic constitue la clé des stratégies de lutte anti-virale.

A partir du milieu des années 1980, le développement spectaculaire des techniques de biologie cellulaire et moléculaire a permis l'accès aux génomes et a nourri des avancées majeures dans le domaine des sciences du vivant, en particulier dans celui de la virologie. Ces techniques ont permis par exemple de caractériser la structure des populations virales et d'en étudier l'évolution. En ce qui concerne plus spécifiquement la virologie végétale, le séquençage des génomes viraux allié au développement des techniques de culture *in vitro* de tissus végétaux a également abouti à l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre les maladies virales, basées sur la transgénèse. L'utilisation comme outils de recherche de plantes transgéniques a à son tour nourri des avancées majeures dans l'étude du fonctionnement des génomes viraux. Elle a également abouti à la découverte de l'interférence ARN, qui révolutionne aujourd'hui tous les domaines de la biologie, et plus particulièrement le génie génétique et la lutte antivirale. Les grands programmes de séquençage ont pour leur part donné accès aux génomes procaryotiques, eucaryotiques et de microorganismes tels que les virus de grande taille. Leur décryptage nous autorise aujourd'hui à aborder les interactions hôte/pathogène sous un angle nouveau, grâce au développement d'approches globales de génomique, transcriptomique et protéomique.

C'est dans ce contexte scientifique fécond aux progrès exponentiels, en équilibre sur deux millénaires et trois continents, que s'inscrivent les travaux de recherche décrits dans ce mémoire. Mon intérêt initial pour les génomes viraux m'a conduit tout d'abord à en étudier l'organisation, le fonctionnement et la diversité afin notamment de mettre en place des stratégies de lutte faisant appel à la transgénèse. Je me suis également attaché à étudier la durabilité et la biosécurité des résistances obtenues dans des variétés transgéniques par l'expression de parties de génomes viraux. Mes travaux actuels, qui portent sur les maladies virales du bananier, ne sont pas éloignés du génie génétique, puisqu'ils concernent en partie des espèces virales de la famille des *Pararetrovirus* ayant la capacité d'intégrer des parties de leur génome dans celui de leurs hôtes, que l'on peut donc considérer comme des plantes naturellement transgéniques.

## 2.1. Analyse, fonctionnement et diversité des génomes viraux

---

### 2.1.1. Le modèle *Potyvirus*

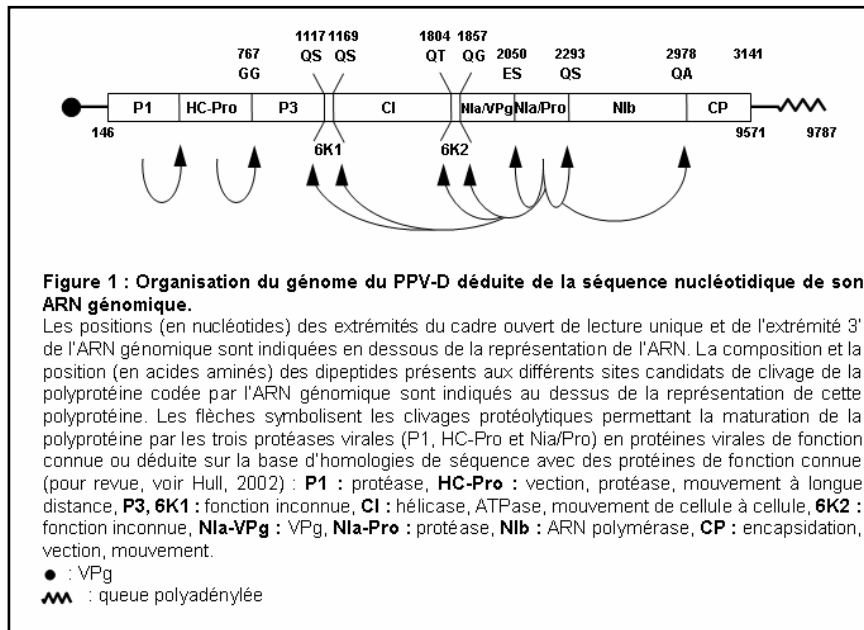
Le genre *Potyvirus* (Fauquet *et al.*, 2005) regroupe, après le genre *Begomovirus*, le plus grand nombre de virus de plantes. L'impact économique des potyvirus sur l'agriculture mondiale explique en partie l'importance des travaux qui leur ont été consacrés depuis une vingtaine d'années, notamment au niveau moléculaire.

A partir du milieu des années 1980, quelques équipes ont initié des programmes de séquençage complet de génomes de potyvirus, qui sont constitués d'un unique ARN d'environ 10 kb et de polarité positive. Les premiers résultats, obtenus en 1986 pour le virus de la gravure du tabac (*Tobacco etch virus*, TEV) et le virus des marbrures des nervures du tabac (*Tobacco vein mottling virus*, TVMV), ont montré que l'ARN génomique des potyvirus est traduit en une seule polyprotéine de grande taille (environ 350 kDa), maturée ensuite par trois protéases d'origine virale en dix protéines distinctes (pour revue, voir Riechmann *et al.*, 1992). Des fonctions ont été attribuées à la plupart de ces protéines sur la base de comparaisons de séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques, d'expériences d'infection de protoplastes ou de plantes entières par des clones infectieux ayant subi une mutagenèse dirigée et d'études d'activité biochimique. A la suite de ces travaux pionniers, de nombreuses équipes se sont lancées elles aussi dans le séquençage nucléotidique partiel ou complet du génome d'autres potyvirus dans le but d'en élucider les mécanismes d'expression et d'en exprimer des parties dans des plantes afin de les rendre résistantes à l'infection.

#### 2.1.1.1. Séquence et organisation du génome du PPV

La Sharka tire son nom d'un mot bulgare signifiant "variole". C'est une maladie qui affecte très gravement les arbres fruitiers du genre *Prunus*, en particulier les pruniers, pêchers et abricotiers. Elle est présente en Europe depuis près d'un siècle et a été décrite plus récemment en Amérique du Sud, aux Etats-Unis et en Inde. Cette maladie est causée par un virus, le *Plum pox virus* (PPV), qui appartient au genre *Potyvirus*. Elle provoque de spectaculaires symptômes de dépigmentation, de déformation et de maturation précoce des fruits, qui sont souvent impropres à la commercialisation et/ou doivent être déclassés. De plus, la présence du virus, qui est inscrit sur la liste des organismes de quarantaine en Europe, interdit également l'exportation de matériel végétal. La Sharka a donc un impact économique important sur l'arboriculture fruitière, principalement en Europe.

Lorsque je l'ai rejoint pour y effectuer mon DEA puis ma thèse, l'équipe de virologie du centre INRA Bordeaux-Aquitaine avait pour principaux modèles d'étude deux népovirus (*Grapevine chrome mosaic virus*, GCMV, et *Tomato black ring virus*, TBRV) et un potyvirus (PPV). Outre la caractérisation moléculaire par séquençage nucléotidique des génomes de ces virus, les groupes travaillant sur les modèles GCMV et PPV avaient pour objectif l'obtention de plantes transgéniques exprimant des parties de ces génomes et résistantes à l'infection. Au sein de cette équipe, mon objectif de recherche était de participer au programme de séquençage complet du génome du PPV, dont j'ai séquencé la moitié 3', et d'exprimer des parties de ce génome dans des plantes transgéniques à des fins de résistance. Dans ce cadre, j'ai construit une banque d'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN génomique d'une des souches du PPV, la souche D. Cette banque a été utilisée pour séquencer entièrement l'ARN génomique, dans un contexte de forte compétition internationale, trois équipes européennes ayant entrepris simultanément le séquençage du génome de souches différentes de PPV. L'organisation génétique du PPV-D déduite de la séquence nucléotidique de son ARN est identique à celle des autres potyvirus séquencés. Sur la base d'homologies de séquences et de conservation de motifs peptidiques caractéristiques d'activités enzymatiques des potyvirus (motif protéase à cystéine des protéines NIa et HC-Pro, motif protéase à sérine de la protéine 34K, motif hélicase de la protéine CI, motif polymérase de la protéine NIb), une fonction a pu être attribuée à certains domaines de cette polyprotéine (voir figure 1).



Des comparaisons de séquences ont révélé un niveau d'homologies supérieur à 98% sur l'ensemble du génome entre les trois souches de PPV entièrement séquencées à l'époque, dont les séquences complètes ont été publiées quasiment simultanément. Le même type de comparaisons a en revanche révélé un pourcentage d'homologie inférieur (81%) avec l'extrémité 3' du génome d'une autre souche séquencé dans notre équipe, El Amar (Wetzel *et al.*, 1991). Depuis, l'obtention et l'analyse de séquences génomiques partielles ou complètes d'autres souches de PPV ont confirmé l'existence de plusieurs groupes de souches (Glasa *et al.*, 2004).

#### Publication :

**Teycheney P.Y.**, Tavert G., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez J. (1989). The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA (strain D). *Nucl. Acid Res.* **17**, 10115-10116.

#### 2.1.1.2. Séquence, organisation et diversité moléculaire du génome du PStV

De mars 1992 à juin 1995, mes travaux de recherche ont porté sur un autre potyvirus, le virus de la maladie des striures de l'arachide (*Peanut stripe virus*, PStV). Ce virus est présent de façon endémique dans toute l'Asie du Sud Est, en particulier dans les pays les plus gros producteurs d'arachide (Chine, Indonésie, Philippines) mais également en Inde et aux Etats-Unis (*Australian Quarantine and Inspection Services*, 1990). Il n'est en revanche pas présent en Australie. Outre sa transmission par puceron sur le mode non persistant, qui bénéficie du concours de nombreux hôtes herbacés jouant le rôle de plantes réservoirs, le PStV peut également être transmis par la graine (Xu *et al.*, 1991). Difficilement contrôlable en zone d'endémie, il provoque des chutes de production considérables pouvant atteindre plus de 80% dans certaines provinces chinoises. Certains isolats provoquent une sévère nécrose qui conduit à la mort des plantes infectées, ce qui explique que le PStV soit considéré comme un des virus les plus dommageables économiquement pour les cultures d'arachide en Asie.

Mes travaux de recherches ont été réalisés dans l'équipe de virologie du *Queensland Agricultural Biotechnology Centre*, qui venait d'être créé par le *Queensland Department of Primary Industries* pour conduire des programmes de recherche en biotechnologie animale et végétale. Mon projet de recherche avait pour objectif l'obtention d'arachides transgéniques résistantes au PStV (voir 2.2.2.2.). Après avoir mis au point un protocole de purification des particules virales, j'ai cloné le génome du PStV sous forme d'ADNc et séquencé son extrémité 3', de même que celle du génome d'un autre potyvirus infectant l'arachide, le virus de la marbrure de l'arachide (*Peanut mottle virus*, PeMoV). Ce dernier est présent en Australie et était à l'époque considéré à tort comme une souche de PStV. La comparaison des séquences nucléotidiques et peptidiques du PStV et du PeMoV que j'ai obtenues a montré qu'il n'en était rien. Elle a également permis de

placer définitivement le PStV dans le sous groupe du virus de la mosaïque commune du haricot (*Bean common mosaic virus*, BCMV) au sein du genre *Potyvirus*.

Afin d'amorcer un programme d'épidémiologie moléculaire du PStV, j'ai cloné et débuté le séquençage des gènes codant la protéine capsidique (CP) ainsi que la région 3' non codante (3'UTR) de 5 souches thaïlandaises de ce virus. La comparaison des séquences nucléotidiques de ces régions, effectuée par C. Higgins après mon départ de l'équipe, a montré que, malgré de fortes différences de symptomatologie entre ces souches et celles précédemment séquencées (Cassidy *et al.*, 1993; Teycheney & Dietzgen, 1994), les parties clonées de leurs génomes présentent des niveaux élevés d'homologies (91.7 à 99.9%). Ces homologies sont plus fortement reliées à l'origine géographique des souches qu'à leur symptomatologie. L'analyse phylogénique de ces séquences indique que les souches de PStV analysées possèdent vraisemblablement un ancêtre commun et que la différenciation de l'ensemble des souches de PStV en deux groupes monophylétiques distincts est intervenue précocement. Contrairement à une souche indonésienne de PStV, PStV-Ib, qui résulte vraisemblablement d'un événement de recombinaison entre les extrémités 3' des génomes du PStV et du virus de la mosaïque de la cornille (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BICMV) (Revers *et al.*, 1996), les souches thaïlandaises de PStV que nous avons étudiées ne semblent pas avoir fait l'objet d'événements de recombinaison dans cette région. Ces résultats sont importants pour le développement d'outils de diagnostics performants et polyvalents ou au contraire capables de détecter spécifiquement différentes souches de PStV (voir 2.2.1.). Les niveaux importants d'homologie observés globalement entre les souches de PStV permettent également de prédire que l'expression dans des arachides transgéniques de la partie du génome du PStV-Ib codant pour la CP (voir 2.2.2.2.) devrait protéger ces plantes contre plusieurs souches de PStV (voir 2.2.2.2.).

#### Publications :

**Teycheney P.Y.**, Dietzgen R. G. (1994). Cloning and sequence analysis of the coat protein gene of an Australian strain of *Peanut mottle* and an Indonesian "blotch" strain of *Peanut stripe potyviruses*. *Virus Res.* **31**, 235-244.

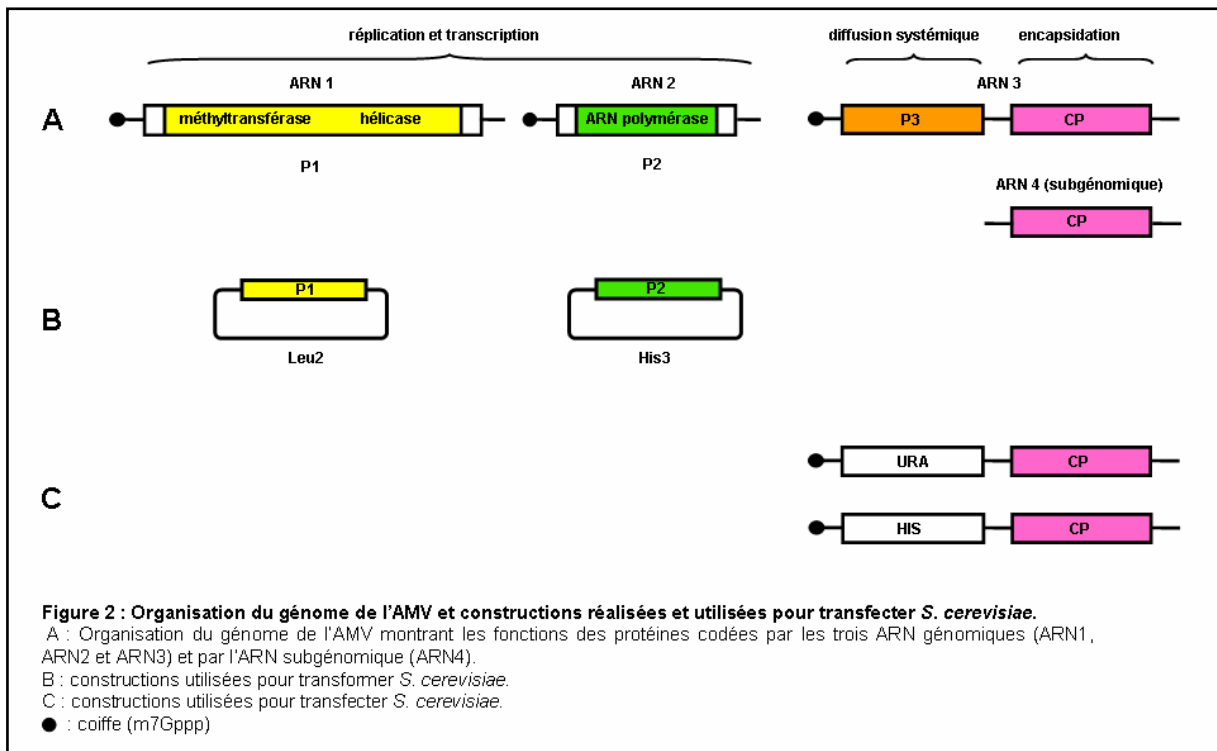
Higgins C.M., Cassidy B.G., **Teycheney P.-Y.**, Wongkaew S., Dietzgen R.G. (1998). Sequences of the coat protein gene of five *Peanut stripe virus* (PStV) strains from Thailand and their evolutionary relationship with other *Bean common mosaic virus* sequences. *Arch. Virol* **143**, 1655-1667.

### 2.1.2. Le modèle *Alfavirus*

Le virus de la mosaïque de luzerne (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) est le membre unique du genre *Alfavirus*, qui appartient à la famille des *Bromoviridae* dont le membre type est le virus de la mosaïque du brome (*Brome mosaic virus*, BMV ; Fauquet *et al.*, 2005). L'organisation génétique de l'AMV (figure 2) est proche de celle du BMV. Leur génome est formé de 3 molécules d'ARN de polarité positive et portant une coiffe (« cap ») à leur extrémité 5'. Les ARN 1 et 2 sont monocistroniques et codent respectivement pour une protéine (P1) portant les domaines hélicase et méthyltransférase et une protéine (P2) portant le domaine ARN polymérase, qui sont impliquées dans la réplication du génome viral. L'ARN3 est quant à lui dicistronique et code pour une protéine (P3) impliquée dans le mouvement des particules virales de cellule à cellule et la protéine capsidique (CP), qui est exprimée à partir d'un ARN subgénomique. Grâce aux travaux effectués pendant une trentaine d'années par l'équipe du Pr John Bol à l'Université de Leiden (Pays-Bas), l'AMV est l'un des virus les mieux caractérisés pour ce qui concerne la réplication virale. J'ai donc choisi d'effectuer un stage post-doctoral dans cette équipe afin d'aborder certains aspects du cycle viral que je ne connaissais pas et d'acquérir de nouvelles techniques de biologie cellulaire et moléculaire.

D'août 1995 à décembre 1997, j'ai travaillé à la mise au point d'un système de réplication de l'AMV chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Un tel système avait été obtenu précédemment pour le BMV par l'équipe de Paul Ahlquist à l'Université du Wisconsin (Janda *et al.*, 1993). Il offre le double avantage d'être plus simple d'utilisation que des protoplastes végétaux, et surtout de donner accès à la génétique classique et moléculaire de la levure, qui est sans doute un des systèmes eucaryotes les mieux caractérisés. Ceci est

particulièrement utile pour étudier les interactions entre protéines cellulaires et protéines virales du complexe de réplication (Restrepo-Hartwig & Ahlquist, 1999). L'objectif de ce projet était d'obtenir une réplicase active chez *S. cerevisiae*, formée des 2 sous unités virales P1 et P2 et de facteurs cellulaires de la levure, comme cela a été obtenu pour le BMV (Quadt *et al.*, 1995). L'intérêt de telles levures transgéniques est de fournir un modèle eucaryote simple pour (i) la caractérisation des facteurs cellulaires de *S. cerevisiae* impliqués dans la formation du complexe de réplication, (ii) l'étude du rôle des différentes séquences de régulation de la réplication portées par les ARN génomiques viraux et (iii) l'étude d'autres aspects de la réplication virale. Cette approche avait donc pour but de permettre de mieux comprendre les interactions plante/virus au cours de la réplication de l'AMV.



**Figure 2 : Organisation du génome de l'AMV et constructions réalisées et utilisées pour transfecter *S. cerevisiae*.**

A : Organisation du génome de l'AMV montrant les fonctions des protéines codées par les trois ARN génomiques (ARN1, ARN2 et ARN3) et par l'ARN subgénomique (ARN4).

B : constructions utilisées pour transformer *S. cerevisiae*.

C : constructions utilisées pour transfecter *S. cerevisiae*.

● : coiffe (m7Gppp)

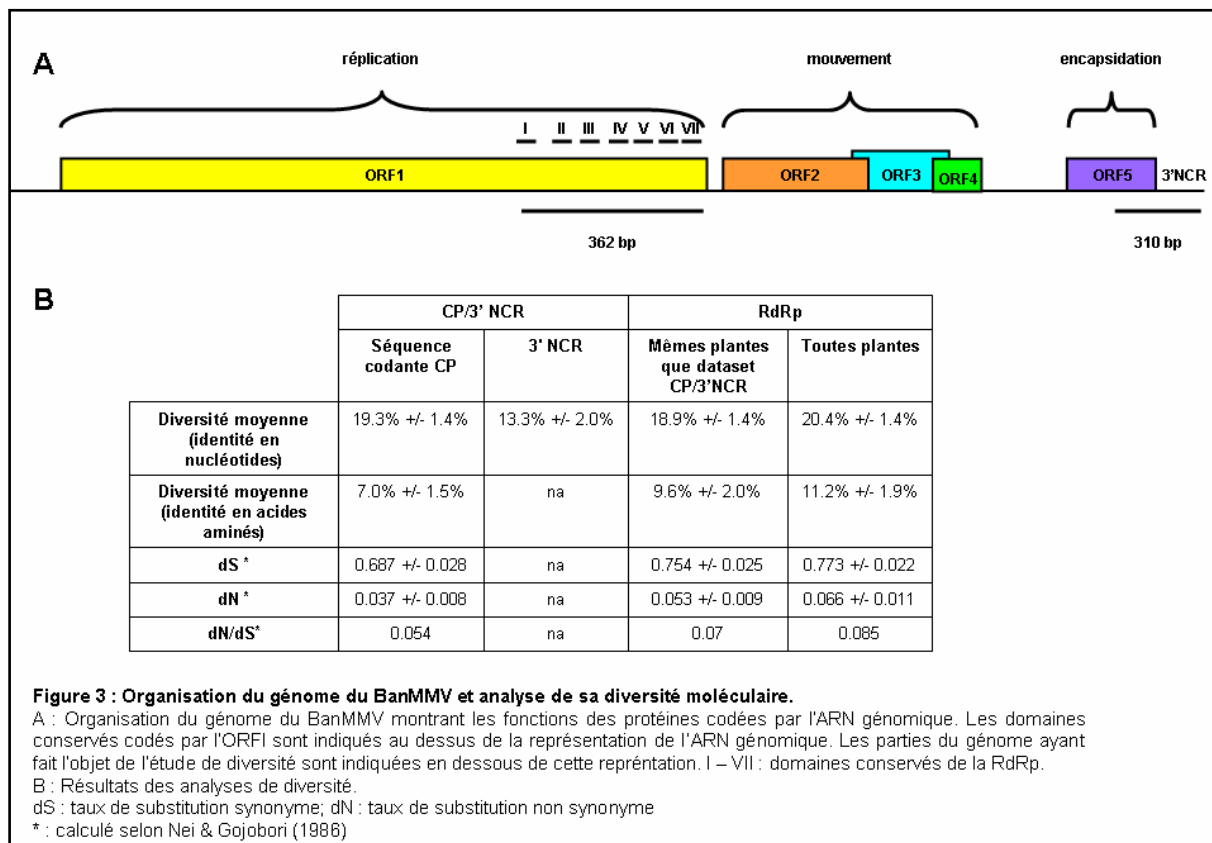
J'ai placé les gènes codant pour les protéines virales P1 et P2 du complexe de réplication de l'AMV sous la dépendance du promoteur et du terminateur du gène ADH-1 de la levure, avec ou sans leurs séquences 5' et 3' non codantes. Ces constructions ont été clonées dans un vecteur navette portant un marqueur d'auxotrophie (Leu ou His ; voir figure 2B) puis introduites par transformation chez *S. cerevisiae*. J'ai également construit plusieurs mutants de l'ARN3 de l'AMV, dans lesquels le gène codant pour la protéine de mouvement (P3), qui n'est pas nécessaire à la réplication du génome viral, a été remplacé par un marqueur d'auxotrophie Ura3 ou His3 (figure 2C). Les transcrits de ces constructions ont servi à transfecter des sphéroplastes des levures transgéniques exprimant les protéines virales P1 et P2. Malgré de nombreuses tentatives, le criblage sur milieu dépourvu d'uracile ou d'histidine n'a pas permis de sélectionner de clones complémentés pour leur caractère auxotrophe, qui aurait résulté de la réplication de l'ARN3 modifié portant un marqueur d'auxotrophie. Afin de m'assurer que l'absence de réplication ne résultait pas d'un problème technique relatif à l'étape critique de transfection des transcrits dans les sphéroplastes, j'ai cloné les constructions ARN3 mutants (figure 2C) sous la dépendance d'un promoteur GAL4 inducible chez la levure par le galactose et réprimé par le glucose. Ces constructions ont été introduites dans les levures transgéniques exprimant les protéines P1 et P2, qui ont ensuite été cultivées en milieu inducteur du promoteur GAL4 afin d'induire la transcription des constructions mutantes, puis repiquées plusieurs fois sur milieu répressif du promoteur afin de sélectionner les clones capables de répliquer les amplicons. Là encore, aucun clone n'a pu être obtenu.



L'ensemble de ces résultats montre que, contrairement au BMV et à d'autres virus de plantes (Alves-Rodrigues *et al.*, 2005), l'AMV ne peut se répliquer dans *S. cerevisiae*. Il est probable que les protéines de levure capables de suppléer les facteurs cellulaires végétaux dans la formation du complexe de réplication du BMV (Kushner *et al.*, 2003 ; Beckham *et al.*, 2007) ne puissent le faire dans le cas du complexe de réplication de l'AIMV.

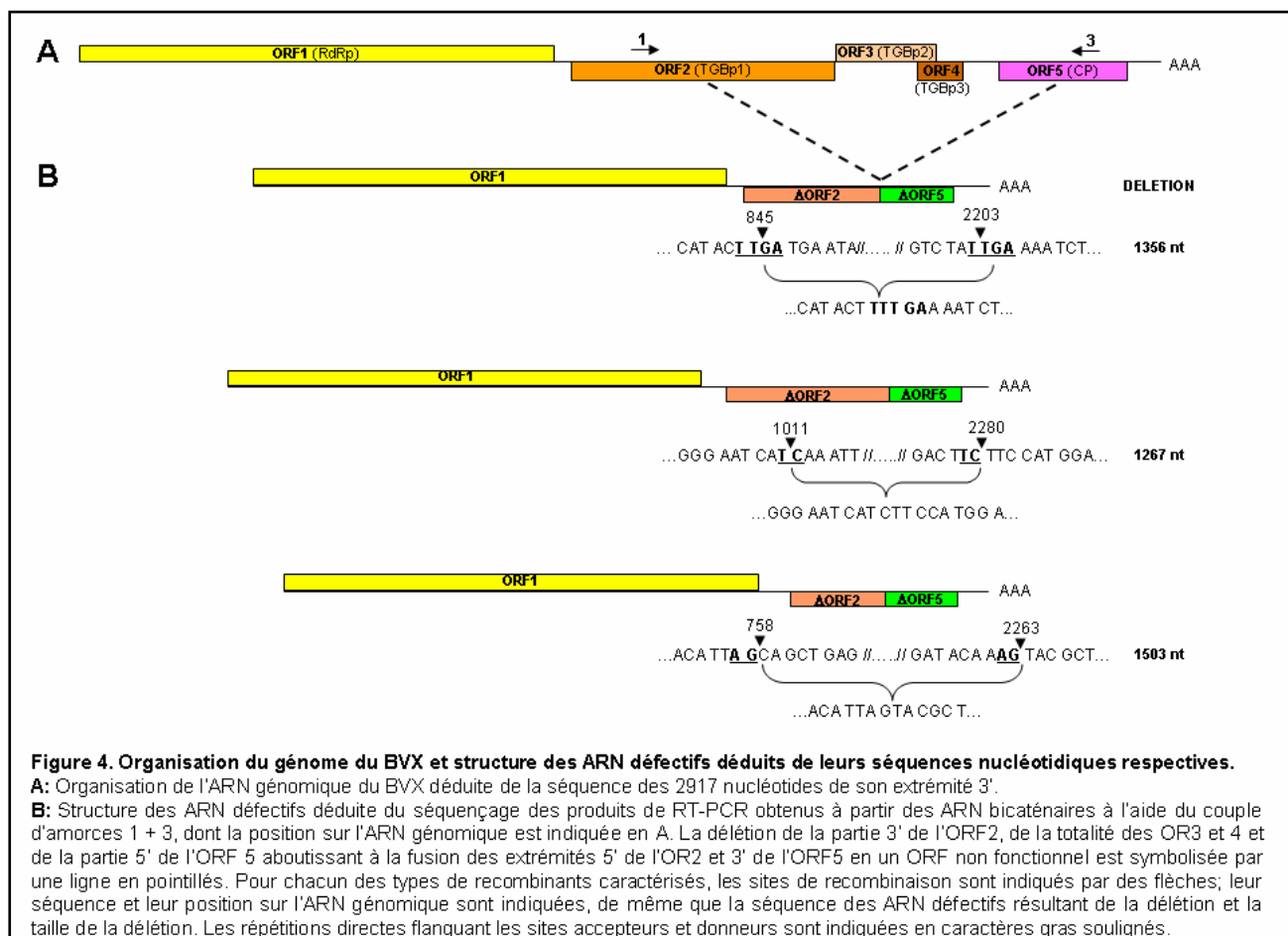
### 2.1.3. Le modèle *Flexivirus*

La famille *Flexiviridae* (Adams *et al.*, 2004) regroupe des virus appartenant aux genres *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus* et *Vitivirus*, ainsi que des virus non reliés à des genres existants, comme par exemple le virus de la mosaïque atténuée du bananier (*Banana mild mosaic virus*, BanMMV). Le BanMMV provoque en infection simple de faibles symptômes de mosaïque chez les variétés de bananier les plus sensibles, et aucun symptôme visible chez la majorité des variétés. En revanche, lorsqu'il est présent en co-infection avec d'autres virus comme le virus de la mosaïque du concombre (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ou les virus de la mosaïque en tirets du bananier (*Banana streak viruses*, BSV), il est responsable de synergies provoquant de graves symptômes nécrotiques. Dans le cadre de travaux de mise au point d'un test de détection immunomoléculaire du BanMMV (voir 2.2.1), j'ai entrepris, en collaboration avec Thierry Candresse (UMR GD2P, INRA Bordeaux Aquitaine), l'étude de la diversité moléculaire de ce virus. Nos travaux ont été réalisés principalement sur les accessions de la collection de bananiers du CIRAD Guadeloupe. Ils se sont focalisés sur la partie de l'ORF1 codant une série de domaines conservés de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) et sur la partie 3' du génome viral comportant la fin de l'ORF 5 codant la protéine capsidique (CP) et la séquence 3' non codante (3' NCR ; figure 3A). Nos travaux ont mis en évidence l'un des niveaux de diversité moléculaire les plus élevés chez un virus de plante, résultant de taux de substitutions synonymes particulièrement importants, quelle que soit la partie du génome considérée (figure 3B). L'analyse statistique des taux de diversité calculés indique que les régions codantes et non codantes du génome du BanMMV sont vraisemblablement soumises à des pressions de sélection différentes.



Le ratio taux de substitution non synonyme / taux de substitution synonyme (dN/dS) est dans la moyenne de ceux observés pour d'autres membres de la famille *Flexiviridae*, ce qui indique que malgré l'accumulation de substitutions synonymes à un taux très élevé, le génome du BanMMV est vraisemblablement soumis à des contraintes évolutives similaires à celles s'appliquant aux autres virus de plantes. Par ailleurs, des taux de substitutions synonymes et non synonymes similaires –voire parfois supérieurs– aux taux moyens présentés dans la figure 3B ont été observés pour des isolats présents simultanément dans une même plante. Ceci indique la présence dans une même plante de populations virales hautement variables au plan moléculaire. Les raisons du maintien d'une telle diversité, malgré son coût évolutif, ne sont pas connues. On peut cependant former l'hypothèse qu'une telle diversité permettrait au BanMMV d'échapper à des mécanismes séquence-spécifiques de dégradation des acides nucléiques basés sur l'interférence ARN. Enfin, nos travaux ont également montré pour la première fois l'existence d'une transmission de plante à plante du BanMMV, bien qu'aucun vecteur de ce virus n'ait été identifié.

Les travaux engagés sur l'étude de la diversité moléculaire du BanMMV ont permis fortuitement la mise en évidence de séquences virales n'appartenant à aucun des virus connus infectant les bananiers. A partir de ces données, des analyses plus poussées ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Thierry Candresse. Elles ont permis de déterminer la séquence nucléotidique d'une partie du génome d'un nouveau virus, qui a été baptisé Banana virus X (BVX). Sur la base de comparaisons de séquences, le BVX a été classé dans la famille des *Flexiviridae* mais n'a pu être rattaché à aucun des genres connus de cette famille. Ce virus revêt donc un intérêt particulier d'un point de vue taxonomique. Nos travaux ont également abouti à la caractérisation au plan moléculaire de plusieurs classes d'ARN défectifs (D-RNA) associés au BVX (figure 4B).



Chacune des classes de D-RNA caractérisée résulte d'un unique évènement de recombinaison aboutissant à la fusion de la partie 5' de l'ORF2 et de la partie 3' de l'ORF5 en un ORF non fonctionnel du fait d'un décalage de la phase de lecture et de la présence de nombreux codons de terminaison. Le BVX diffère

sur ce point d'autres membres de la famille *Flexiviridae*, tels le virus de la mosaïque commune du manioc (CsCMV ; Calvert *et al.*, 1996), le virus de la mosaïque du bambou (BaMV ; Yeh *et al.*, 1999) ou le virus de la mosaïque du trèfle blanc (WCIMV ; White *et al.*, 1991, 1999) chez lesquels les D-RNA caractérisés résultent d'une recombinaison entre les ORF1 et 3 et aboutissent à un ORF fonctionnel.

Les premières données récoltées lors de campagnes de prospection réalisées en Guadeloupe par F. Péréfarres lors de son stage de M2 permettent de noter une faible prévalence (inférieure à 1%) du BVX dans la bananeraie guadeloupéenne et un très faible niveau de diversité moléculaire dans la région du génome ciblée, qui est homologue à celle utilisée pour l'étude de diversité moléculaire du BanMMV pourtant proche du BVX d'un point de vue phylogénique : pour le BVX, le taux de divergence moyen dans cette région est de 1.7% et le taux de divergence maximal de 3.6%. À ce jour, le BVX n'a été détecté qu'en Guadeloupe. Les essais de détection que nous avons effectués à partir d'ARN totaux extraits d'échantillons foliaires prélevés en Colombie, en Equateur, au Cameroun et à Cuba se sont avérés infructueux, de même que les essais de détection réalisés par le QDPI&F en Australie. Cette situation pourrait résulter soit de l'absence effective de BVX ailleurs qu'en Guadeloupe, soit d'un titre viral particulièrement faible rendant la détection très difficile.

#### Publications :

**Teycheney P.-Y.**, Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., Candresse, T. (2005). High genetic variability and evidence for plant-to-plant transfer of *Banana mild mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **86**: 3179-3187.

**Teycheney P.-Y.**, Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse, T. (2005). Molecular characterization of banana virus X (BVX), a novel member of the *Flexiviridae*. *Arch. Virol.* **150**: 1715-1727.

Péréfarres F., Le Provost G., Acina I., Lockhart BEL, Iskra-Caruana ML, Candresse T., **Teycheney P.-Y.** (2008). Detection, prevalence and diversity of *Banana streak viruses* (BSV), *Banana mild mosaic virus* (BanMV) and Banana virus X (BVX) in Guadeloupe. *Acta horticulturae* (sous presse).

## 2.2. Mise au point de stratégies de lutte antivirale

Les nombreux programmes de séquençage complets ou partiels de génomes viraux entrepris à partir du milieu des années 1980 ont de multiples objectifs, dont la mise au point de nouveaux outils moléculaires de détection (sondes, amorces PCR) et le développement de stratégies de lutte basés sur la transgénèse. Les activités que j'ai conduites à l'aide des différents modèles sur lesquels ont porté mes travaux de recherche m'ont permis d'aborder chacun de ces domaines.

### 2.2.1. Mise au point d'outils moléculaires de diagnostic

La détermination de la séquence nucléotidique partielle ou totale de génomes viraux a notamment pour objectif la mise au point d'outils moléculaires de diagnostic: sondes nucléotidiques pour la détection par hybridation moléculaire, amorces pour la détection par des méthodes basées sur la PCR. Les données de séquence que j'ai obtenues ont abouti à la mise au point d'outils de diagnostic pour plusieurs virus :

- sondes nucléotidiques radiomarquées pour la détection du PPV par hybridation moléculaire et amorces oligonucléotidiques pour le diagnostic du PPV par PCR (Candresse *et al.*, 1995, 1998)
- sondes non radioactives pour la détection du PSTV, adoptées par les services de quarantaine australiens pour l'indexation de masse des importations d'arachide ; amorces oligonucléotidiques utilisables pour la détection du PSTV par RT-PCR
- gène hybride permettant l'expression de la protéine capsidique du PeMoV dans *E. coli* et l'obtention d'un antiserum, en collaboration avec un laboratoire indien de l'*International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics* (ICRISAT)
- amorces oligonucléotidiques pour la détection du BVX par immunocapture reverse transcription nested PCR (IC-RT-PCR)

Par ailleurs, une méthode d'indexation du BanMMV par immunocapture reverse transcription nested PCR a été mise au point en collaboration avec l'équipe de T. Candresse (INRA Bordeaux Aquitaine). Elle est basée sur l'utilisation d'amorces fortement dégénérées contenant des résidus inosine mises au point pour la détection des flexivirus infectant les arbres fruitiers (Foissac *et al.*, 2005). L'utilisation d'amorces dégénérées permet de s'affranchir du niveau élevé de diversité moléculaire mis en évidence chez le BanMMV (Teycheney *et al.*, 2005a).

Enfin, la détection des virus de la mosaïque en tirets du bananier (*Banana streak viruses*, BSV) par immunocapture PCR a été optimisée par G. Le Provost dans le cadre de son séjour post doctoral, dont j'ai assuré l'encadrement conjointement avec M.-L. Caruana. Cette méthode est maintenant utilisée par les services de la protection des végétaux pour l'indexation en routine des espèces BSV.

#### Publications :

Wetzel T., Taver G., **Teycheney P.Y.**, Ravelonandro M., Candresse T., Dunez J. (1990). Dot hybridization detection of plum pox virus using 32P-labeled RNA probes representing non-structural viral protein genes. *J. Virol. Meth.* **30**, 161-172

Dietzgen R.G., Xu Z., **Teycheney P.Y.** (1994). Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease* **78**, 708-711.

Le Provost G., Iskra-Caruana M.-L., Acina I., **Teycheney, P.-Y.** (2006). Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. *J. Virol. Meth.* **137**: 7-13.

**Teycheney P.-Y.**, Acina I., Lockhart B. E. L., Candresse T. (2007). Detection of *Banana mild mosaic virus* and *Banana virus X* by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR). *J. Virol. Meth.* **142** : 41-49.

### 2.2.2. Obtention de plantes transgéniques exprimant des séquences virales

En 1986, un article retentissant de l'équipe de Roger Beachy, de l'Université de St Louis (Etats-Unis), consacrait l'émergence des plantes transgéniques résistantes aux virus (Powell Abel *et al.* 1986). Pour la première fois était appliquée la théorie dite de "résistance dérivée du pathogène" énoncée l'année précédente (Sanford & Johnson, 1985). Cette théorie reposait notamment sur l'observation du phénomène de prémunition, qui permet de protéger certaines plantes contre une infection par une souche virale fortement pathogène en leur inoculant préalablement une souche faiblement pathogène du même virus. Bien que les mécanismes de ce phénomène fussent inconnus à l'époque, Sanford et Johnson postulèrent que l'expression constitutive, chez un organisme hôte, d'un fragment du matériel génétique d'un agent pathogène, par exemple un virus, protège cet hôte contre une infection par ce pathogène.

L'obtention de variétés hybrides résistantes aux maladies virales nécessite la mise en place de programmes de sélection variétale et de croisements longs et fastidieux. Ces programmes sont d'autant plus ardues que l'on dispose souvent de peu de géniteurs de résistance. La culture de variétés tolérantes permet de restaurer la productivité dans des zones de forte endémie, mais elle contribue également au maintien d'un taux de contamination élevé, voire à son augmentation. L'alternative offerte par la résistance dérivée du pathogène paraît donc indiquée dans le cas de nombreux virus de plantes. De fait, l'expression de séquences virales dans des plantes transgéniques a permis de protéger de nombreuses espèces végétales contre des virus très dommageables économiquement (Fuchs & Gonsalves, 2007). C'est donc cette approche que j'ai développée pour lutter contre plusieurs virus affectant gravement des plantes cultivées.

#### 2.2.2.1 Obtention de lignées de tabac transgéniques exprimant des parties du génome du PPV

Au cours de ma thèse, j'ai obtenu quatre gènes hybrides permettant l'expression de parties du génome du PPV-D dans des plantes transgéniques (figure 5) :

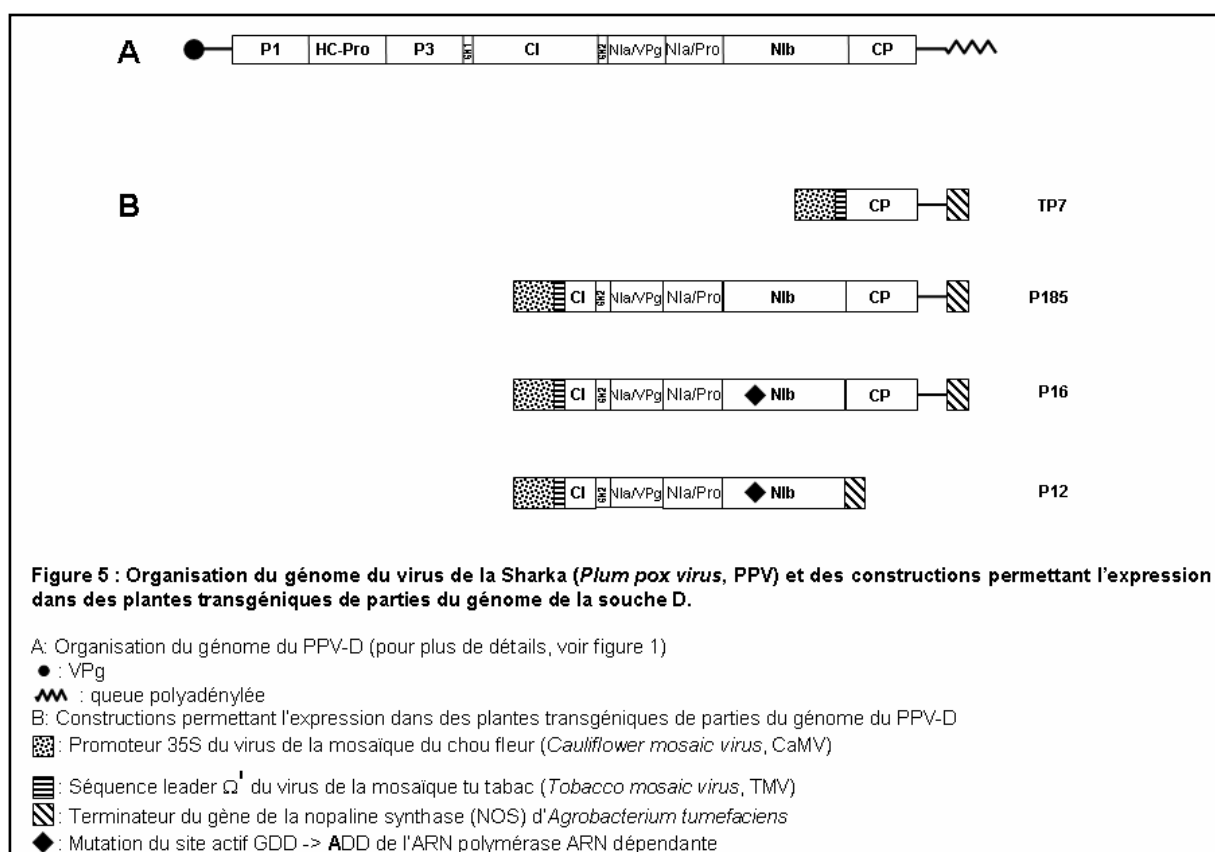
- **TP7** : permet l'expression de la forme native de la protéine capsidique (CP), portant un résidu méthionine surnuméraire à son extrémité aminoterminal.

- **P185** : permet l'expression de la moitié 3' du génome viral, notamment celle de la forme native de la CP issue de la maturation en *trans* d'une partie de la polyprotéine virale par la protéase Nia/Pro.
- **P16** : permet l'expression des mêmes protéines que la construction P185, à l'exception de la protéine Nib dans laquelle le résidu G du site actif GDD a été muté (**ADD**). Chez le bactériophage Q $\beta$ , une substitution de ce type abolit l'activité ARN polymérase ARN dépendante (Inokuchi & Hirashima, 1987) : la protéine mutée perd son activité catalytique mais conserve sa capacité à se fixer sur son substrat, l'ARN viral, et entre en compétition avec l'ARN polymérase native pour cette fixation. La construction P16 a été réalisée afin de tester l'efficacité de la protection conférée conjointement par l'expression de la CP et de la protéine Nib mutée.
- **P12** : permet l'expression des mêmes protéines que la construction P16 à l'exception de la CP. Cette construction a été réalisée afin de tester l'efficacité de la protection conférée par l'expression de la seule protéine Nib mutée dans son site actif.

La régénération des variétés de *Prunus* sensibles à l'infection par le PPV, après transformation par *Agrobacterium* ou par bombardement, n'étant à l'époque pas au point, l'efficacité de ces constructions a tout d'abord été testée dans des plantes modèles :

- *Nicotiana tabacum* cv xanthi, hôte systémique de nombreux potyvirus mais pas du PPV, m'a permis de tester la résistance croisée à l'infection par un potyvirus hétérologue, le virus Y de la pomme de terre (*Potato virus Y*, PVY)
- *Nicotiana benthamiana*, hôte systémique du PPV, a été utilisé dans le but de tester la résistance à l'infection par ce virus, ces derniers travaux ayant été réalisés après mon départ de l'équipe.

Plusieurs lignées de *N. tabacum* transformées se sont montrées protégées contre le PVY, le niveau de résistance étant indépendant du niveau d'expression du transgène viral. Il est possible que certaines des résistances observées résultent d'un phénomène d'interférence ARN, comme cela a été démontré ultérieurement pour plusieurs autres potyvirus, dont le PPV (Lindbo *et al.*, 1992; Dougherty *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1998 ; Scorza *et al.*, 2001 ; Hily *et al.*, 2004 & 2005 ; Kundu *et al.*, 2008). Après la fin de ma thèse, de nouvelles constructions ont été réalisées (Jacquet *et al.*, 1998) et plusieurs variétés de *Prunus* exprimant la capsid du PPV ont été obtenues, dont certaines sont immunes à l'infection par le PPV. Elles ont été évaluées avec succès au champ en conditions d'infection endémique, en Pologne (Hily *et al.*, 2004).



**Publications :**

Ravelonandro M., **Teycheney P.Y.**, Tavert G., Wetzel T., Monsion M., Delbos R.P., Dunez J. (1990). Genomic organization of plum pox virus and recombinant DNA technology to combat plum pox virus, *Acta Horticulturae* **283**, 295-304.

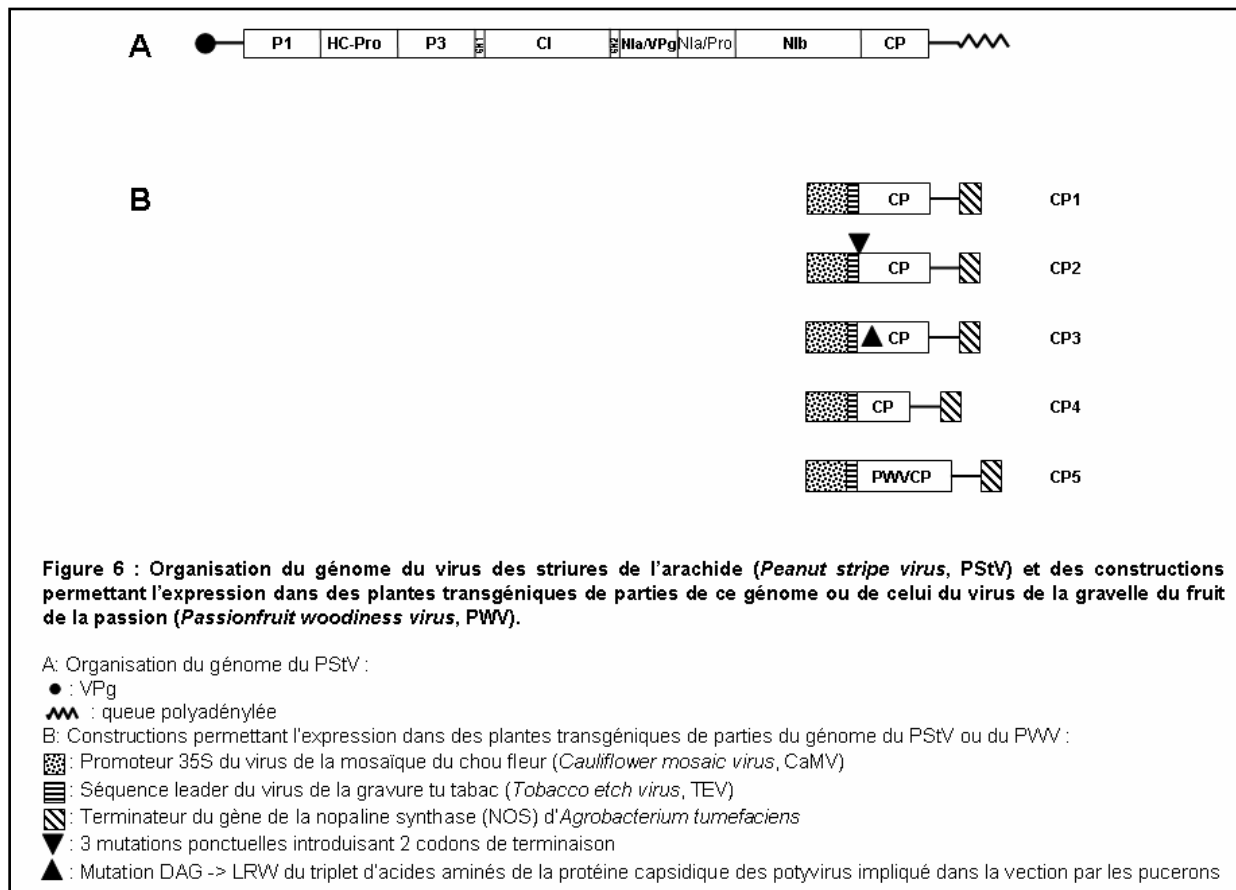
Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R. P., Dunez J. (1992). Construction of a chimaeric viral gene expressing *Plum pox virus* coat protein. *Gene* **120**, 167-173.

Ravelonandro M., Monsion M., **Teycheney P.Y.**, Delbos R.P., Dunez J. (1992). Transgenic tobacco plants that contain the plum pox virus (PPV) coat protein. *Acta Horticulturae* **309**, 191-196.

#### 2.2.2.2. Obtention de lignées d'arachides transgéniques exprimant le gène codant pour la protéine capsidique du PStV

Le criblage des 11000 génotypes d'arachide cultivée (*Arachis hypogaea*) conservés en Inde par l'ICRISAT (*International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics*) n'a pas permis d'identifier de gène de résistance au PStV utilisables à des fins de création de variétés hybrides résistantes. Seules quelques espèces sauvages d'*Arachis* génétiquement incompatibles avec les espèces cultivées présentent une résistance. En conséquence, le projet sur lequel j'ai travaillé en Australie visait à créer des lignées d'arachide transgéniques résistantes au PStV. Pour cela, j'ai construit quatre gènes hybrides permettant l'expression dans des plantes transgéniques de la forme native ou modifiée du gène codant la protéine capsidique du PStV (voir figure 6) :

- **CP1** : permet l'expression de la forme native de la protéine capsidique (CP), portant un résidu méthionine surnuméraire à son extrémité aminoterminal
- **CP2** : permet l'expression de l'ARN messager du gène codant la CP du PStV mais pas la protéine elle-même.
- **CP3** : permet l'expression d'une forme modifiée de la CP du PStV. Le triplet DAG nécessaire à la transmission du virus par pucerons (Atreya *et al.*, 1991) a été modifié par mutagenèse dirigée, afin d'éviter l'encapsulation, la transmission de virus initialement non-transmissibles.
- **CP4** : permet l'expression d'une forme de CP du PStV déléetée de ses 50 résidus aminoterminaux



De plus, un gène hybride **CP5** permettant l'expression de la protéine capsidique du virus de la gravelle du fruit de la passion (*Passionfruit woodiness virus*, PWVV) délétée de ses 50 résidus aminoterminaux a également été construit, dans le but de tester l'efficacité de la protection croisée contre l'infection par le PSTV conférée par l'expression de cette protéine (voir figure 6B).

J'ai obtenu des lignées de *Nicotiana benthamiana* transgéniques exprimant séparément ces constructions après transformation par *A. tumefaciens*. Ces lignées ont été évaluées en conditions contrôlées pour la résistance au PSTV : 70% des lignées exprimant la construction CP2 ont montré à l'état homozygote (R2) une immunité à l'infection par le PSTV (Dietzgen *et al.*, 1999).

Parallèlement, j'ai travaillé, en collaboration avec le département de botanique de l'Université du Queensland et un chercheur indonésien que j'ai encadré, à la mise au point d'un système de transformation de l'arachide par *A. tumefaciens*. Pour cela, j'ai utilisé différents types de tissus (disques foliaires, embryons immatures, embryons somatiques) de plusieurs cultivars commerciaux (McCubbin, Gajah, Robut, NC7). Seuls quelques cals des variétés Gajah et Mc Cubbin obtenus après transformation d'embryons immatures par une construction 35S-GUS ont montré une expression transitoire du gène GUS. Comme dans tous les précédents et multiples essais de transformation de l'arachide, la régénération de plantes entières à partir des tissus transformés s'est avérée extrêmement difficile. La mise au point de techniques de transformation par bombardement de particules sur cals embryogènes issus de graines (Livingstone & Birch, 1999) a permis, après mon départ de l'équipe, d'obtenir des lignées d'arachides transgéniques exprimant les constructions que j'ai réalisées (Higgins *et al.*, 2004), pour les cultivars commerciaux Gajah et NC7. Certaines des lignées exprimant la construction CP2 ou la construction CP4 se sont montrées immunes après inoculation mécanique du PSTV.

#### 2.2.2.3. Obtention de lignées de tabac transgéniques exprimant le gène codant la protéine capsidique du CMV ou du LMV

Dans le cadre de mes activités de recherche à l'INRA de Versailles, j'ai appliqué en collaboration avec M. Jacquemond (INRA Montfavet) le concept de résistance dérivée du pathogène à une variété commerciale de tabac brun Burley développée par la SEITA, BB16, à des fins de protection contre le virus de la mosaïque du concombre (*Cucumber mosaic virus*, CMV) et le virus Y de la pomme de terre (*Potato virus Y*, PVY), deux des principaux virus infectant le tabac. Des lignées transgéniques de tabac BB16 exprimant un gène hybride codant une forme modifiée de la protéine capsidique du virus de la mosaïque de la laitue (CpLMVΔ, permettant d'obtenir une protection croisée contre le PVY) ou la protéine capsidique du virus de la mosaïque du concombre (CpCMV) ont été obtenues par nos équipes. Ces lignées ont montré de bons niveaux de résistance au PVY et au CMV respectivement, en conditions expérimentales contrôlées ou au champ.

#### Publication :

Jacquemond M, **Teycheney P.-Y.**, Carrère I., Navas-Castillo J., Anselem J., Tepfer, M. (2001). Resistance phenotypes of transgenic tobacco plants expressing different cucumber mosaic virus (CMV) coat protein genes. *Mol. Breeding* **8**, 85-94.

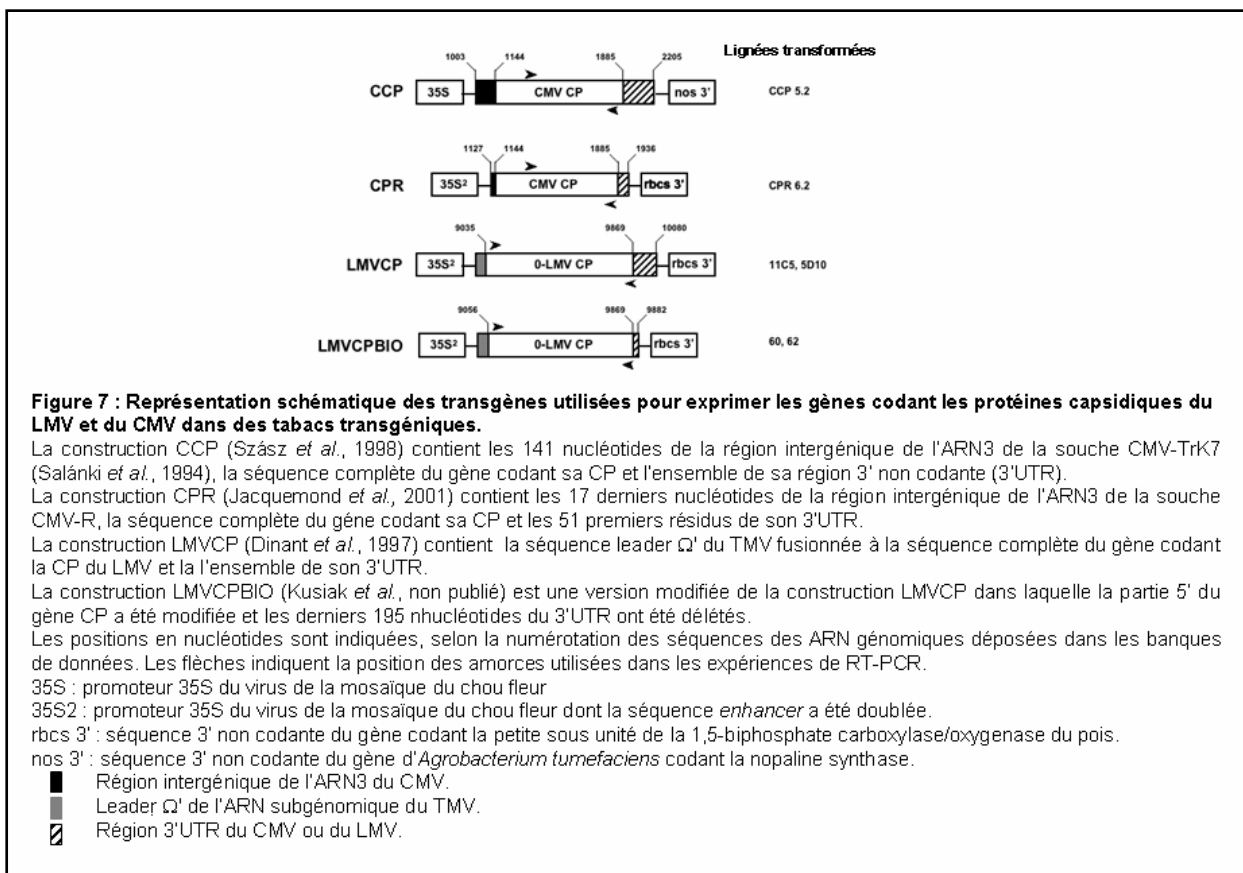
### 2.3. Biosécurité des plantes transgéniques exprimant des séquences virales et stabilité des phénotypes modifiés par transgène

Les plantes transgéniques ont trouvé de nombreuses applications, notamment dans la protection des cultures contre les agents pathogènes et les ravageurs. Leur utilisation au champ nécessite cependant au préalable un certain nombre d'études visant à évaluer leur impact éventuel sur les écosystèmes et la durabilité des phénotypes modifiés, en particulier lorsqu'ils sont basés sur une modification des régulations épigénétiques de l'expression des gènes. Dans le cas de plantes transgéniques exprimant des séquences virales, le risque potentiel majeur de leur utilisation au champ concerne l'émergence de nouvelles souches virales issues de recombinaison entre les transgènes viraux ou leurs transcrits et le génome de virus (Greene

& Allison, 1994; Aaziz & Tepfer, 1999 ; Teycheney & Tepfer, 1999). Une partie de mes activités de recherche à l'INRA de Versailles a donc porté à la fois sur l'étude de la biosécurité de plantes transgéniques exprimant des séquences virales et sur la stabilité de modifications phénotypiques basées sur des mécanismes de régulation épigénétique de l'expression de gènes.

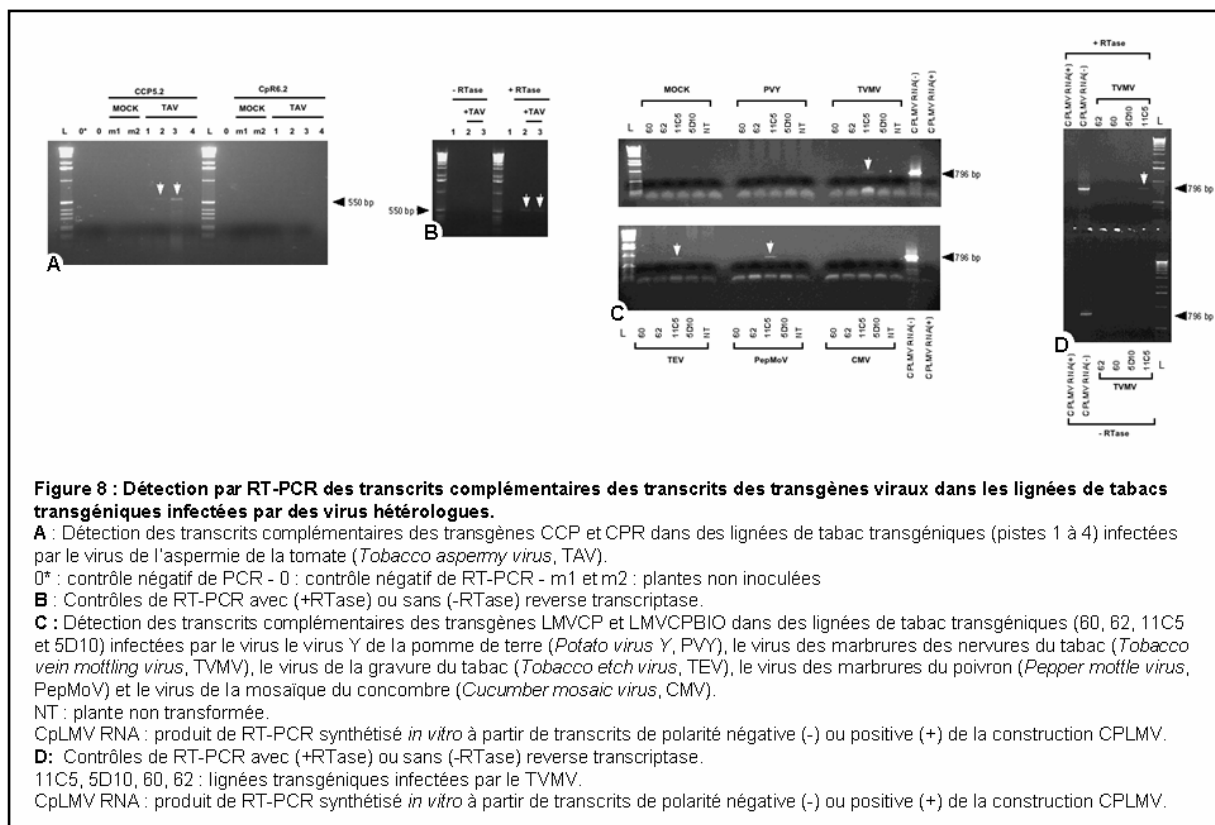
### 2.3.1. Limitation des risques potentiels liés à l'utilisation de plantes transgéniques exprimant des séquences virales

Des travaux réalisés à l'aide de lignées de tabac transgéniques exprimant des parties du génome du virus de la mosaïque de la laitue (*Lettuce mosaic virus*, LMV) ou du CMV (figure 7) m'ont permis de démontrer que l'extrémité 3' non codante (3'UTR) des génomes viraux dans les transcrits des transgènes peut être reconnue par des réplicases virales hétérologues.



Lors d'infections hétérologues par des virus appartenant au même genre (*Cucumovirus* pour les transgènes CPCMV et CCP ; *Potyvirus* pour les transgènes LMVCP et LMVCPBIO), la réplicase de ces virus peut reconnaître la séquence 3' non codante (3'UTR) contenue dans les transgènes et synthétiser un transcrit complémentaire du transgène (figure 8). Ce phénomène pourrait favoriser la recombinaison entre les transcrits de transgènes viraux exprimés dans des plantes transgéniques et l'ARN génomique de virus, et par conséquent l'émergence de virus recombinants. Ces travaux ont également montré que la délétion de la séquence 3' non codante des transgènes viraux empêche cette synthèse de transcrit complémentaire et réduit le risque de recombinaison avec des ARN génomiques viraux.





Parallèlement à ces travaux, je me suis également intéressé à un autre risque lié à l'utilisation de plantes transgéniques : la présence dans le génome des plantes transformées de gènes de résistance à des antibiotiques utilisés comme marqueurs de sélection. Le plus utilisé est un gène de résistance à la kanamycine, un antibiotique (en réalité un complexe d'antibiotiques, kanamycines A, B et C) de la classe des aminoglycosides découvert chez la bactérie *Streptomyces kanamyceticus*. Bien que les utilisations thérapeutiques et cliniques de la kanamycine soient très limitées en raison de sa toxicité, la présence d'un gène de résistance à cet antibiotique dans les plantes transgéniques constitue selon certains un risque car il pourrait être transféré chez certaines bactéries pathogènes et compromettre leur contrôle par antibiothérapie. Dans le cadre du stage de DU de S. Maugendre que j'ai encadré, nous avons évalué la possibilité de régénérer des lignées de tabac transgéniques transformées par les constructions CCP et CPLMVBIO (voir figure 7) à l'aide d'un vecteur binaire dépourvu de marqueur de sélection, pBBLRBB, obtenu par C. Tourneur au laboratoire. Une méthode de criblage de masse par PCR des plantules régénérées *in vitro* a été mise au point. Elle utilise des amorces spécifiques du transgène ainsi que des amorces spécifiques du gène *vir* d'*A. tumefaciens*. Ces travaux ont permis l'obtention d'une lignée de tabac Burley BB16 transformée par la construction CPLMVBIO sur 161 transformants primaires testés. Malgré ce faible taux de réussite, cette approche reste avantageuse par rapport à celles permettant d'éliminer a posteriori du génome d'une plante transformée un marqueur de résistance (système Cre/lox, rétrocroisements).

#### Publication :

**Teycheney P.-Y.,** Aaziz R., Dinant S., Salánki K., Tourneur C., Balázs E., Jacquemond M., Tepfer M. (2000). Synthesis of (-)-strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *J. Gen. Virol.* **81**, 1121-1126.

### 2.3.2. Evaluation des risques de modification du phénotype de plantes transgéniques résultant d'infections par des virus suppresseurs du *silencing*

De nombreux caractères phénotypiques sont modifiés *via* des mécanismes d'extinction post transcriptionnelle (*post transcriptional gene silencing*, PTGS), notamment dans des plantes transgéniques. En particulier, des résistances aux virus peuvent être obtenues par l'expression dans des plantes de séquences virales. Celles-ci induisent la dégradation des transcrits viraux ou cellulaires présentant une forte homologie avec la séquence exprimée par le transgène. Cependant, des gènes hétérologues peuvent parfois être éteints par des mécanismes de PTGS résultant de l'expression d'un transgène, comme l'ont montré certains de nos travaux à l'INRA de Versailles (Berthomé et al., 2000b).

Des mécanismes naturels de résistance antivirale, notamment chez les plantes, sont eux aussi basés sur la PTGS (Voinnet, 2001). Afin de contourner ces mécanismes, de nombreux virus codent pour des protéines inhibitrices de PTGS (Voinnet, 2005). En conséquence, la stabilité des modifications phénotypiques induites par l'expression de transgènes et reposant sur la PTGS pourrait être menacée par l'infection par un ou des virus codant pour un inhibiteur de PTGS. Outre la majorité des plantes transgéniques résistantes aux virus, c'est également le cas de variétés génétiquement modifiées afin d'obtenir l'extinction d'un gène codant pour un allergène en surexprimant ce gène (Rommens *et al.*, 2004 ; Le *et al.*, 2006). Le même type de risque existe pour des traits agronomiques résultant de régulations naturelles de gènes ou de voies métaboliques par des mécanismes de PTGS (Metzlaff *et al.*, 1997).

Afin d'évaluer ce risque, j'ai utilisé plusieurs variétés de pétunia chez lesquelles le gène codant pour la chalcone synthase (*chs-A*), qui est impliquée dans la voie de biosynthèse des anthocyanes, est régulé spatialement par PTGS : les fleurs de ces variétés présentent une alternance de secteurs blancs, dans lesquels le gène *chs-A* est éteint, et de secteurs mauves, dans lesquels il est exprimé (Metzlaff *et al.*, 1997 ; voir figure 9A). Mes travaux ont montré que dans les fleurs de pétunias d'une de ces variétés (Starmania) infectée par le PVY, le CMV ou le TEV, il existe une corrélation spatiale entre l'inhibition de la PTGS du gène *chs-A* et l'accumulation d'ARN viral (voir figure 9B et 9C). Cette corrélation suggère que dans les secteurs blancs de fleurs de plantes infectées, les cellules infectées sont incapables de transmettre aux cellules adjacentes un éventuel signal diffusible d'inhibition de la PTGS du gène *chs-A*. Les différences de pigmentation observées entre les plantes infectées par le PVY, le CMV ou le TEV (figure 9A) reposeraient donc sur des aptitudes différentes de ces virus à envahir certains groupes de cellules dans lesquels la PTGS du gène *chs-A* serait inhibée, comme cela a été montré ultérieurement sur un autre modèle (Senda et al., 2004) et à l'instar des symptômes viraux de mosaïque qui reposent eux aussi sur une inhibition localisée de mécanismes de résistance basés sur la PTGS (Hirai et al., 2008).

Ces résultats illustrent le risque de réversion d'un phénotype modifié par PTGS vers un phénotype sauvage à la suite d'une infection par un virus inhibiteur de la PTGS. De nombreux autres phénotypes modifiés par PTGS dans des plantes transgéniques (couleur des fleurs, composition des graines en acides gras, diminution du niveau d'un allergène) pourraient eux aussi revenir à leur état sauvage à la suite d'infections par des virus inhibiteurs de la PTGS.

#### Publications :

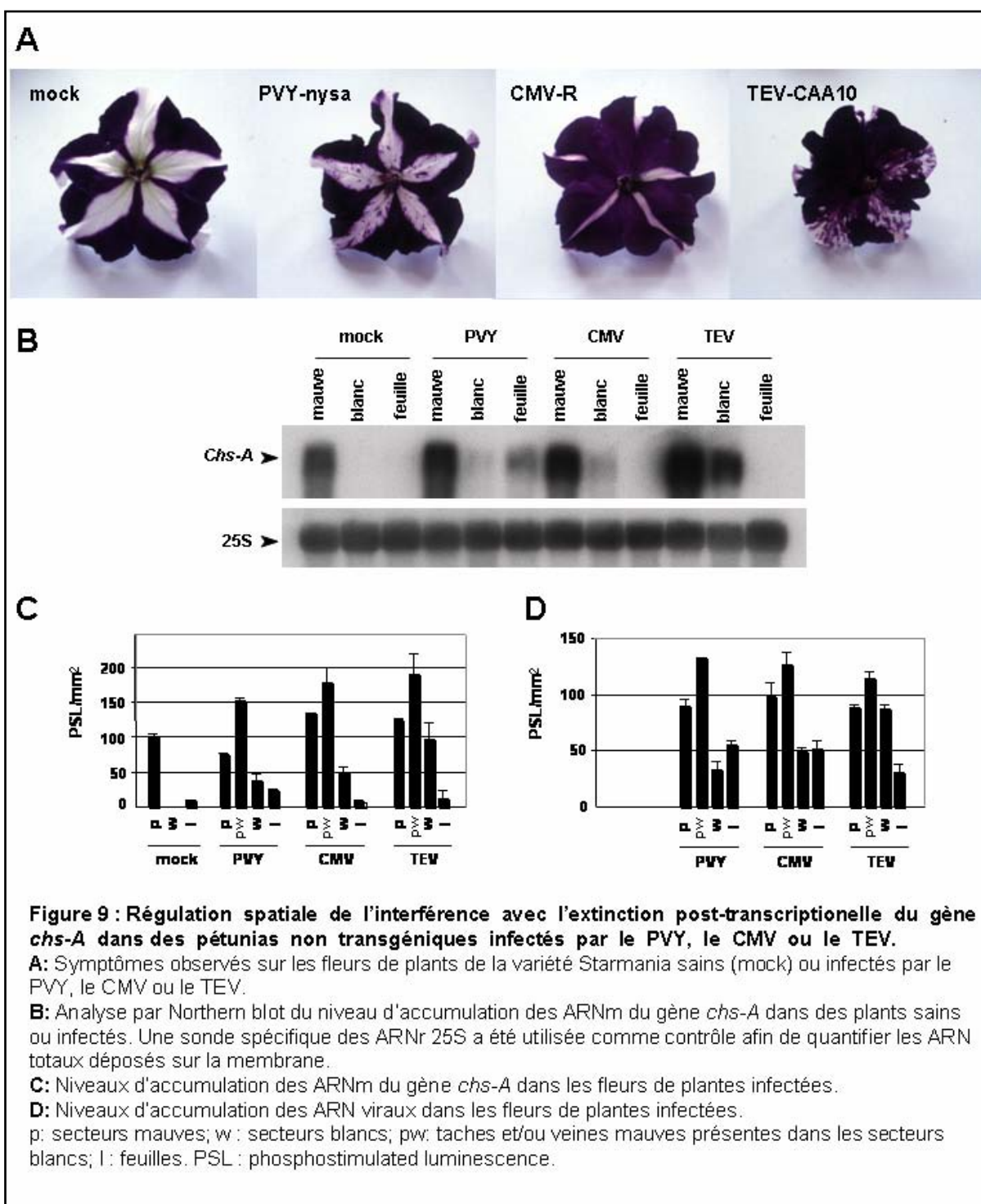
**Teycheney P.-Y.** (1999). Plantes et virus : la guerre sans fin. *Biofutur* **189**, 30-33.

Berthomé R., **Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (2000). Mécanismes de résistance aux virus dans les plantes transgéniques. *Virologie* **4**, 49-60.

Berthomé R., **Teycheney P.-Y.**, Renou J.P., Okada Y., Tepfer, M. (2000b). Expression of a yeast RNase III gene in transgenic tobacco silences host nitrite reductase. *Plant Molecular Biology* **44**, 53-60

**Teycheney P.Y.**, Tepfer, M. (2001). Virus-specific spatial differences in the interference with *chs-A* gene silencing in non-transgenic Petunia. *J. Gen. Virol.* **82**, 1239-1243.

**Teycheney, P.-Y.**, Tepfer, M. (2002). Interactions spatiales entre infection virale et extinction post-transcriptionnelle chez le pétunia. *Virologie* **6**, 303-304.



## 2.4. Pararetrovirus endogènes

---

Le génome de nombreuses plantes cultivées héberge des séquences virales, en particulier de pararetrovirus endogènes (*endogenous pararetrovirus*, EPRV ; pour revue voir Harper *et al.*, 2002 ; Staginnus & Richert Pöggeler, 2006). Par exemple, des séquences EPRV du BSV sont présentes dans le génome d'une espèce de bananier, *Musa balbisiana*. Certaines de ces séquences, qualifiées de pathogènes, peuvent être à l'origine de particules virales infectieuses, *via* des processus d'activation (Harper *et al.*, 1999 ; Ndowora *et al.*, 1999). Ce mode de transmission horizontal s'ajoute à un mode de transmission vertical classique par cochenille ou à une transmission par voie végétative. Des facteurs biotiques, comme les croisements génétiques, ou abiotiques, comme les écarts de température ou la culture *in vitro*, sont capables d'activer les EPRV BSV pathogènes et de conduire à la synthèse de particules virales infectieuses (Dallot *et al.*, 2000 ; Folliot *et al.*, 2005). Ceci est notamment le cas pour les hybrides interspécifiques *M. acuminata* (A) x *M. balbisiana* (B) triploïdes (AAB) et tétraploïdes (AAAB) de plantain et de bananier, qu'ils soient naturels ou créés. En conséquence, le risque d'activation des EPRV BSV constitue actuellement l'obstacle principal au déploiement d'hybrides interspécifiques *M. acuminata* x *M. balbisiana*, et plus généralement à l'utilisation de *M. balbisiana* dans les schémas de création variétale.

Des travaux visant à caractériser les mécanismes d'activation de ces séquences ont été mis en œuvre dans le cadre d'un projet européen du 5<sup>e</sup> PCRD dont j'ai assuré la coordination scientifique, conjointement avec M.-L. Caruana (CIRAD Montpellier). Au cours de ce projet, G. Le Provost a entrepris, dans le cadre de son séjour post doctoral, l'étude du rôle de la méthylation dans l'activation des EPRV BSV pathogènes. Pour cela, il a réalisé une analyse du différentiel de méthylation chez les descendant triploïdes (AAB) sains et malades issus d'un même croisement (AAA x BB). Cette analyse a abouti à la mise en évidence et la caractérisation de séquences méthylées spécifiquement chez les individus malades. La plupart de ces séquences ne correspondent à aucun gène connu. Une d'entre elles correspond à un marqueur AFLP associé à la maladie (Lheureux *et al.*, 2003) et une autre à une séquence étiquetée (EST) présentant un domaine de fixation de l'ADN (*DNA-binding TFAR19-related protein*).

Parallèlement, nous avons également entrepris des travaux visant à évaluer le risque de diffusion à grande échelle du BSV résultant du déploiement de variétés AAB ou AAAB. Ces travaux ont pour objectif de permettre de statuer sur l'opportunité de diffuser des variétés hybrides interspécifiques existantes et sur l'utilisation des ressources *M. balbisiana* dans les schémas de création variétale, qui fait depuis 2001 l'objet d'un moratoire au CIRAD en raison du risque BSV. Aucune variété hybride interspécifique n'a été diffusée aux Antilles Françaises. En revanche, les variétés traditionnelles de plantain largement présentes en Martinique et en Guadeloupe sont de génotype AAB et peuvent donc servir de modèle pour étudier la prévalence du BSV dans des espèces hybrides. Dans le cadre de son stage de M2, F. Péréfarres a évalué les niveaux de prévalence des principales espèces de BSV (BSGFV, BSOLV, BSMysV et BSI<sub>mv</sub>) en Guadeloupe dans des variétés *M. acuminata* et dans des variétés de plantain de génotype AAB. Ce travail a été poursuivi par A. A. Dghim dans le cadre de son stage de DESR puis par I. Acina, technicienne supérieure de l'équipe. Dans le cas des variétés *M. acuminata* (banane dessert), seul du matériel garanti indemne de virus (vitroplant) est utilisé pour la plantation aux Antilles Françaises et les contaminations observées sont donc nécessairement le résultat d'une transmission du virus par ses vecteurs biologiques, des cochenilles. Dans le cas des plantains en revanche, les plantations sont effectuées à l'aide de rejets dont l'état sanitaire n'est pas contrôlé : les contaminations peuvent donc résulter soit de l'utilisation de rejets contaminés soit d'une activation de séquences EPRV BSV pathogènes. Nos résultats montrent que les niveaux de prévalence du BSV dans la bananeraie guadeloupéenne divergent fortement selon le type de matériel considéré. Ce niveau est négligeable (0.7%) sur banane dessert de génotype AAA, ce qui indique un faible niveau de transmission par vecteur. En revanche, il est important (39.1%) sur plantain de génotype AAB. Cependant, l'origine des contaminations dans ce dernier cas (activation vs utilisation de matériel contaminé) n'a pas pu être établie.

Enfin, des travaux de caractérisation des EPRV BSV ont également été entrepris dans notre équipe par I. Acina. Son travail a permis de dresser pour chacune des accessions *M. balbisiana* de la collection de

musacées du CIRAD un profil des EPRV des principales espèces BSV. Cet inventaire entre dans le cadre d'un programme visant à améliorer les géniteurs *M. balbisiana* afin de les utiliser pour la création d'hybrides interspécifiques ne présentant pas de risque d'activation d'EPRV BSV pathogènes (voir 3.2.3.4.).

**Publications :**

**Teycheney P.-Y.**, Caruana, M.-L. (2002). Bananier : l'ennemi intérieur. *La recherche* **353**: 34-38.

Iskra-Caruana M.-L., Lheureux F., **Teycheney, P.-Y.** (2003). Les Pararetrovirus endogènes (EPRV), voie nouvelle de transmission des virus de plantes. *Virologie* **7** : 255-265.

**Teycheney P.-Y.**, Tepfer M. (2007). Possible roles of endogenous plant viral sequences and transgenes containing viral sequences in both virus resistance and virus emergence. *Environ. Biosafety Res.* **6**: 19-21.

Hohn T., Richert-Pöggeler K., Staginnus C., Harper G., Schwartzacher T., Teo C.-H., **Teycheney P.-Y.**, Iskra-Caruana M.-L., Hull R. (2008). Evolution of integrated plant viruses. M. Roosinck ed., Springer.

Péréfarres F., Le Provost G., Acina I., Lockhart BEL, Iskra-Caruana ML, Candresse T., **Teycheney P.-Y** (2008). Detection, prevalence and diversity of *Banana streak viruses* (BSV), *Banana mild mosaic virus* (BanMV) and *Banana virus X* (BVX) in Guadeloupe. *Acta horticulturae* (sous presse).



### 3. Projet scientifique

Mes activités de recherche actuelles ont pour objectif de contribuer à lever les contraintes virales pesant sur l'amélioration variétale des espèces polyploïdes d'intérêt pour mon unité de rattachement (agrumes, ananas, banane et plantain, canne à sucre, plantes horticoles et plantes à racines et tubercules : taro, igname, patate douce). Elles portent principalement sur la caractérisation des populations virales affectant les bananiers et plantains aux Antilles françaises, notamment à des fins de mise au point et d'optimisation d'outils de diagnostic adaptés, et d'élaboration de stratégies de lutte contre les EPRV BSV pathogènes intégrés dans le génome *M. balbisiana*.

Le projet scientifique que je souhaite développer s'inscrit dans la continuité des recherches que je mène au CIRAD Guadeloupe depuis 6 ans. Il s'inscrit aussi à la fois (i) dans le projet scientifique de l'Unité Propre de Recherche « Multiplication Végétative » à laquelle je suis rattaché et qui a pour objectif la maîtrise des processus de création, de sélection et de diffusion de formes améliorées d'espèces à multiplication végétative et (ii) dans le domaine thématique « Mécanismes et diversité des interactions parasitaires et symbiotiques » du département « systèmes biologiques » de rattachement de l'Unité. Ce projet s'articule autour de deux axes thématiques :

- Diversité et structure des populations virales des bananiers et plantains : impact sur le fonctionnement des génomes viraux et l'émergence de maladies.
- Evaluation et gestion du risque lié à l'activation des EPRV BSV pathogènes.

Ce projet repose sur (i) le renforcement de l'équipe dans un premier temps par le recrutement d'un chercheur post doctoral et de doctorants, (ii) la poursuite des collaborations nationales et internationales mises en place depuis déjà plusieurs années et (iii) le développement d'approches et d'outils communs avec nos collègues du CIRAD Guadeloupe spécialistes en santé vétérinaire, dans l'objectif de créer en Guadeloupe un pôle de recherche sur les maladies infectieuses et vectorielles animales et végétales à l'échelle de la Caraïbe et un réseau régional de surveillance et de contrôle des maladies et ravageurs des plantes cultivées.

Les virus constituent des contraintes importantes pour la création, la conservation et la diffusion de matériel végétal. Dans le cas des espèces polyploïdes, qui sont souvent stériles et propagées par voie végétative, certaines de ces contraintes virales sont spécifiques. En effet, peu de virus étant transmis par la graine, la multiplication sexuée permet un assainissement vis-à-vis de la plupart des virus. Chez les plantes à multiplication végétative, l'absence de reproduction sexuée ne permet pas cette possibilité d'assainissement. C'est notamment le cas des variétés de bananiers et de plantains alimentaires, qui sont sélectionnées pour leur caractère parthénocarpique. De plus, les pararetrovirus endogènes (EPRVs), qui sont présents dans le génome de nombreuses plantes cultivées, ne posent de réels problèmes pour la création variétale que dans le cas des bananiers et plantains, qui sont multipliés végétativement.

A ce jour, six espèces virales distinctes infectant bananiers et plantains ont été caractérisées (Fauquet *et al.*, 2005 ; Teycheney *et al.*, 2005b) de même que deux espèces infectant l'abacá (*Musa textilis*; Gambley *et al.*, 2004 ; Sharman *et al.*, 2008 ; voir tableau 1).

**Tableau 1 : Virus infectant les espèces *Musa***

<b>Virus</b>	<b>Répartition géographique</b>	<b>Mode de transmission par vecteur</b>	<b>Vecteur</b>	<b>Famille taxonomique</b>	<b>Génome</b>
<b><i>Abacá bunchy top virus</i> (ABTV)</b>	Philippines, Malaisie	Semi persistant, circulant	<i>Pentalonia nigronervosa</i>	<i>Nanoviridae</i>	ADN
<b><i>Abacá mosaic virus</i> (AbaMV)</b>	Philippines	Non persistant	Plusieurs espèces de pucerons	<i>Potyviridae</i>	ARN
<b><i>Banana bract mosaic virus</i> (BBrMV)</b>	Philippines, Inde, Sri Lanka, Samoa occidentales	Non persistant	Plusieurs espèces de pucerons	<i>Potyviridae</i>	ARN
<b><i>Banana bunchy top virus</i> (BBTV)</b>	Asie, Australie, Pacifique, Afrique	Semi persistant, circulant	<i>Pentalonia nigronervosa</i>	<i>Nanoviridae</i>	ADN
<b><i>Banana mild mosaic virus</i> (BanMMV)</b>	Afrique, Australie, Pacifique, Amérique centrale, Amérique du sud, Caraïbes	Inconnu	Inconnu	<i>Flexiviridae</i>	ARN
<b><i>Banana streak viruses</i> (BSV)</b>	Mondiale	Semi persistant	Cochenilles	<i>Pararetroviridae</i>	ADN
<b><i>Banana virus X</i> (BVX)</b>	Guadeloupe	Inconnu	Inconnu	<i>Flexiviridae</i>	ARN
<b><i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)</b>	Mondiale	Non persistant	Plusieurs espèces de pucerons	<i>Cucumoviridae</i>	ARN

A l'instar de la majorité des virus infectant les plantes cultivées, aucune source naturelle de résistance n'est connue pour ces virus. Leur contrôle repose donc essentiellement sur le diagnostic, l'éradication des plantes malades et leur remplacement par du matériel végétal garanti sain. Chacun de ces virus peut être transmis par voie végétative, c'est-à-dire par l'utilisation de matériel végétal non certifié, mais aucun ne l'est par la graine. La plupart d'entre eux est également transmise par des insectes vecteurs (voir tableau 1). Les maladies qu'ils provoquent



ont des impacts très inégaux sur la production de bananes, de plantains et d'abacá (Jones, 2000) : pour un même virus, la gravité des symptômes peut varier en fonction de la sensibilité variétale, des conditions environnementales et de l'agressivité des souches ou espèces virales. Si l'on peut estimer que le virus le plus dommageable économiquement au niveau mondial pour la culture bananière est le BBTV, dont l'aire de présence s'accroît en Afrique et dans le Pacifique en raison d'une absence de programmes de contrôle et d'éradication, le BSV constitue pour sa part la principale contrainte pour la création de nouvelles variétés hybrides de bananiers et de plantains et leur diffusion. En effet, la présence d'EPRV BSV pathogènes dans le génome de *Musa balbisiana* compromet gravement la création de nouvelles variétés hybrides résistantes aux maladies –notamment cryptogamiques–, qui est l'unique alternative à la lutte chimique et aux problèmes qu'elle pose pour l'environnement, la santé humaine et le contrôle durable des maladies. Elle fait également du BSV un modèle original pour l'étude de l'émergence d'espèces virales liées à l'activation d'EPRV pathogènes.

### **3.1. Diversité et structure des populations virales des bananiers et plantains : impact sur le fonctionnement des génomes viraux et l'émergence de maladies**

---

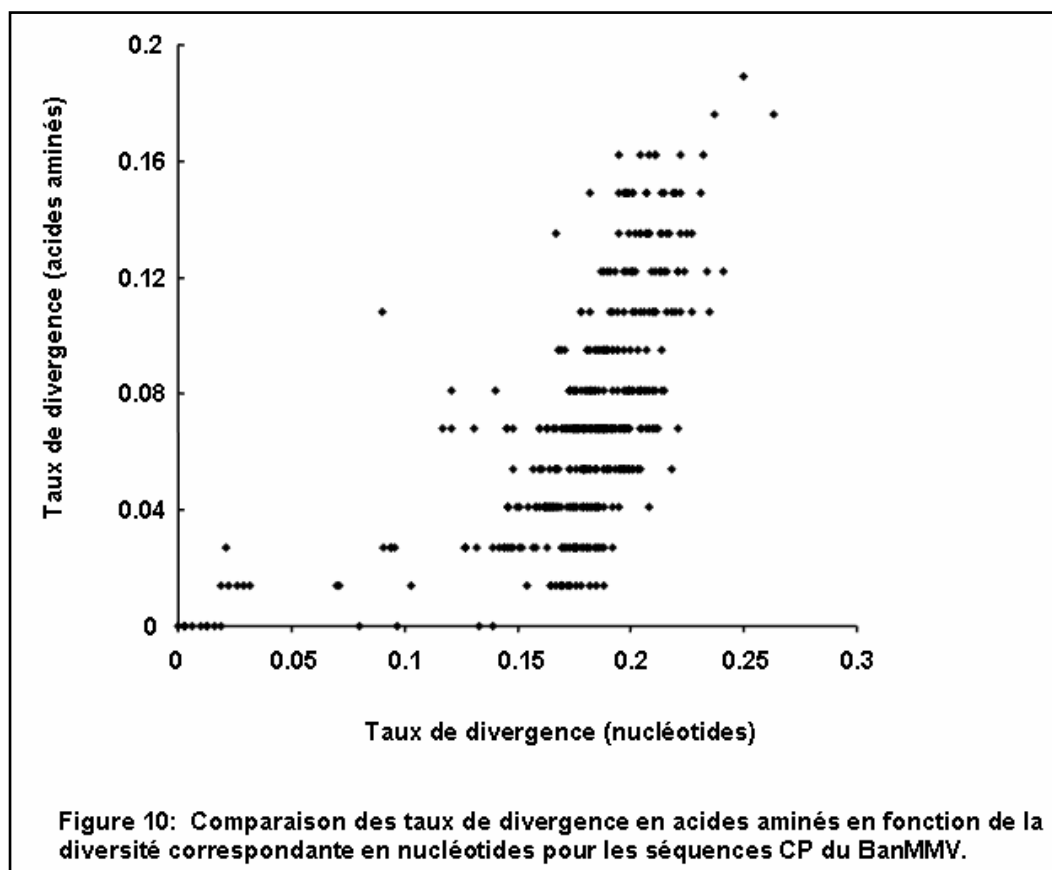
#### **3.1.1. Situation du sujet**

Le bananier n'étant ni une plante modèle ni un hôte expérimental particulièrement accommodant, peu d'études ont été effectuées sur la diversité et la structure des populations virales qu'il héberge, à l'exception notable des travaux sur la diversité moléculaire des populations de BSV réalisés par G. Harper (Harper *et al.*, 2005 ; Jaufeerally-Fakim *et al.*, 2005) et des populations de BanMMV que nous avons réalisés en collaboration avec T. Candresse (Teycheney *et al.*, 2005a) :

Dans le cas du BSV, un nombre croissant de séquences nucléotidiques complètes ou partielles est disponible dans les banques de données. Ces séquences présentent de très forts niveaux de diversité (Harper *et al.*, 2005 ; Fargette *et al.*, 2006), qui ont amené à requalifier certaines souches en espèces virales. Certaines de ces espèces BSV sont d'ailleurs plus proches de badnavirus infectant d'autres plantes, tels le *Sugarcane bacilliform virus* (ScBV) qui infecte la canne à sucre, que d'autres espèces ou souches de BSV. L'étude de prévalence des principales espèces de BSV que nous avons conduite en Guadeloupe a montré qu'aucun des échantillons indexés positif ne présente de symptôme visible et que les espèces BSV détectées n'ont d'impact notable ni sur plantain ni sur banane dessert en Guadeloupe. Ces travaux confirment que, si elle existe, la transmission du BSV par les espèces vectrices de cochenilles déjà caractérisées (*Planococcus citri*, *P. ficus* et *Dismyococcus brevipes*) de plantain vers banane dessert est faible en Guadeloupe, pour des raisons qui restent à déterminer.

Dans le cas du BanMMV, nos travaux ont mis en évidence des niveaux importants de diversité dans les parties du génome codant respectivement plusieurs domaines conservés de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) et l'extrémité carboxyterminale de la CP (voir partie 2.1.3.1.). Les raisons du maintien d'une telle diversité à l'intérieur de la population virale restent à déterminer, de même que l'impact des mutations non synonymes sur la structure et le fonctionnement des protéines virales. Sur ce dernier point, il convient de noter que des situations très contrastées ont été observées entre les séquences analysées, bien qu'une corrélation positive globale existe entre les taux de divergence des séquences en acides aminés et en nucléotides. Dans le cas des séquences CP par exemple, un taux de divergence de 18% entre séquences nucléotidiques correspond à des séquences en acides aminés présentant des taux de divergence compris entre 1.5% et 15% ; à l'inverse, un taux de divergence de 1.5% entre séquences en acides aminés correspond à des séquences en nucléotides présentant des taux de

divergence compris entre de 2% et 19% (voir figure 10). Une situation similaire existe pour les séquences RdRp.



Par ailleurs, les maladies émergentes et infectieuses (*emerging infectious diseases*, EID) représentent un enjeu mondial d'importance croissante pour la santé publique (humaine et animale) et l'agriculture. Plusieurs exemples d'émergence récente chez les plantes d'EID, notamment d'étiologie virale, démontrent l'impact de ces dernières sur la production agricole et la sécurité alimentaire mondiales (pour revue, voir Anderson *et al.*, 2004). Une des meilleures façons d'anticiper l'émergence de nouvelles maladies virales consiste à dresser un inventaire exhaustif des virus infectant un hôte. En effet, il est communément admis que seule une minorité des virus est aujourd'hui connue et parfois caractérisée. En particulier, les virus asymptomatiques voire bénéfiques ne sont généralement découverts que fortuitement, comme en témoigne notamment le cas du BVX. Il est vraisemblable que de nombreux virus silencieux ont établi avec leur hôte un équilibre, en particulier dans le cas d'infections chroniques chez les plantes maintenues par la multiplication végétative. La rupture de cet équilibre pourrait conduire à l'émergence de maladies

### 3.1.2. Objectifs du projet

Le BSV et le BanMMV sont des modèles déjà étudiés dans notre équipe. Ils continueront donc de faire l'objet d'études de diversité et de structure des populations virales :

- Dans le cas des espèces BSV, les études de diversité réalisées en Guadeloupe seront élargies à d'autres zones de présence du virus. Elles ont pour objectif l'optimisation des techniques de détection et leur adaptation à de nouvelles espèces virales, ainsi que la

recherche dans le génome nucléaire de *M. balbisiana* d'EPRV BSV correspondant à de nouvelles espèces BSV. Elles alimenteront également le programme d'évaluation et de gestion du risque lié à l'activation d'EPRV BSV pathogènes (voir 3.2.) que nous souhaitons mettre en place et coordonner au niveau international.

- Dans le cas du BanMMV, des travaux visant à mesurer l'impact de la diversité moléculaire du génome viral sur son fonctionnement seront entrepris, par des comparaisons de structure 3D des protéines virales entre isolats présentant de forts niveaux de diversité moléculaire.

En outre, la découverte fortuite du BVX (Teycheney *et al.* 2005b) peut laisser supposer que d'autres virus encore inconnus infectent le bananier. Dans le cadre de programmes de recherche sur les maladies émergentes, une recherche systématique de nouvelles espèces virales présentes dans les espèces *Musa* sera entreprise par des techniques de type métagénomique.

### 3.1.3. Démarche

#### 3.1.3.1. Diversité des espèces BSV

La caractérisation moléculaire des espèces BSV repose sur l'utilisation d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification d'une partie de l'ORF3 codant pour les domaines reverse transcriptase (RT) et ribonucléase H (RH). Deux types d'amorces ciblant cette partie du génome sont disponibles :

- des amorces spécifiques des espèces BSOLV, BSGFV, BSMysV, BSCavV, BSACVnV et BSIhV,
- des amorces dégénérées dessinées sur la base de comparaison de séquences de badnavirus.

Les amorces espèce-spécifiques sont utilisées en diagnostic de routine par la technique de multiplex immunocapture PCR (M-IC-PCR) que nous avons mise au point (Le Provost *et al.*, 2006) et qui permet de s'affranchir de la présence de séquences BSV endogènes dans le génome *M. balbisiana*. Les amorces dégénérées sont pour leur part utilisées pour la caractérisation de nouvelles espèces de badnavirus soit en M-IC-PCR soit en direct binding PCR (DB-PCR) afin d'accroître le spectre des espèces BSV détectées. L'analyse d'échantillons foliaires conjointement par M-IC-PCR à l'aide d'amorces espèce spécifiques et par M-IC-PCR ou DB-PCR à l'aide d'amorces dégénérées est la stratégie la plus efficace pour identifier de nouvelles espèces BSV. Elle permet d'éliminer les échantillons infectés par une des espèces connues (positifs en M-IC-PCR avec les amorces espèces spécifiques et en M-IC-PCR ou DB-PCR avec les amorces dégénérées) et de sélectionner ceux infectés seulement par une nouvelle espèce (négatifs en M-IC-PCR avec les amorces espèces spécifiques et positifs en M-IC-PCR ou DB-PCR avec les amorces dégénérées).

Si l'utilisation de cette approche n'a pas permis de caractériser de nouvelles espèces BSV en Guadeloupe, elle a en revanche permis d'en identifier sur banane dessert dans des échantillons récoltés dans 3 provinces cubaines (La Havane, Ciego de Avila et Granma), dans le cadre de la thèse d'E. Javer Higginson dont j'assure la co-tutelle. L'inventaire complet de la diversité des espèces BSV à Cuba sera poursuivi jusqu'à la fin de cette thèse, prévue en 2011. Ce travail a pour objectifs d'étudier et de comparer les niveaux de prévalence des différentes espèces BSV à Cuba, d'en étudier l'épidémiologie et de rechercher de nouveaux EPRV BSV dans le génome de *M. balbisiana* afin d'évaluer le risque d'émergence de nouvelles espèces virales par le déploiement à grande échelle de variétés hybrides de bananier et plantain. Un travail identique est prévu en République Dominicaine dans le cadre d'un projet en collaboration visant notamment à évaluer le risque de diffusion des espèces BSV par le déploiement à grande échelle de variétés hybrides de bananier. Les données obtenues seront utilisées pour mettre au point des amorces permettant la détection par M-IC-PCR des nouvelles espèces BSV identifiées.

### 3.1.3.2. Impact de la diversité moléculaire sur le fonctionnement des génomes viraux

Nos travaux ont montré que le BanMMV présente une forte diversité moléculaire dans la région 3' de l'ORF1 qui code pour des domaines conservés de la RdRp, notamment son domaine catalytique GDD, et dans la région 3' de l'ORF5 qui code pour la CP (voir figure 3 et partie 2.1.3.1.). Les raisons pour lesquelles une telle diversité est maintenue, malgré son coût évolutif, ne sont pas connues. Plus généralement, aucune étude de l'impact de la diversité moléculaire des génomes viraux sur la structure tridimensionnelle de protéines ou de sites catalytiques de protéines virales stratégiques pour les étapes clés de l'infection (réplication, mouvement, encapsidation) n'a jamais été entreprise. Aussi, dans le cadre d'une collaboration mise en place avec Dominique Marion spécialiste de la structure tridimensionnelle des protéines à l'Institut de Biologie Structurale du CNRS Grenoble accueilli au CIRAD Guadeloupe et de la collaboration existante avec T. Candresse (INRA Bordeaux Aquitaine), nous souhaitons élucider la structure tridimensionnelle de certaines protéines du BanMMV et la comparer entre des isolats présentant de forts taux de mutations non synonymes dans les ORF correspondants. Ces études structurales seront réalisées par résonance magnétique nucléaire (RMN). Contrairement à la cristallographie, cette technique ne nécessite pas d'obtenir de cristaux, mais elle est en revanche limitée par la taille maximale des protéines pouvant être étudiées, qui se situe actuellement autour de 30 kDa.

L'organisation du génome des *Flexiviridae* comporte 5 ou 6 cadres ouverts de lecture (ORF) codant trois classes de protéines (pour revue, voir Adams *et al.*, 2004), ce qui en fait des modèles adaptés à une étude structurale. Dans le cas du BanMMV (voir figure 3) :

- L'**ORF1** code pour une réplicase dont la taille varie de 150 à 200 kDa. Cette protéine comporte plusieurs domaines fonctionnels distincts dont les deux plus importants sont un domaine hélicase et un domaine ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) présents dans la partie C-terminale. Des modèles structuraux sont disponibles pour les classes 1 et 3 des RdRp des virus à génome ARN (Koonin *et al.*, 1991) mais pas pour la classe 2 à laquelle appartiennent les flexivirus (pour plus de détails, voir <http://pfam.janelia.org/scan?id=RdRP>).
- Trois petits ORF chevauchants (**ORF2, 3 et 4** ; *triple gene block* ou TGB) codent pour des protéines impliquées dans le mouvement intercellulaire et à longue distance du génome viral, sous forme de complexes ribonucléoprotéiques associant protéines virales et génome viral. Le système de transport, commun à plusieurs genres de virus à ARN<sup>+</sup>, est basé sur l'action coordonnée de ces 3 protéines pour permettre au complexe ribonucléoprotéique de franchir les plasmodesmes en augmentant la taille d'exclusion limite, et au génome viral d'entrer dans les cellules voisines (Morozov & Solovyev, 2003).
- L'**ORF5** code pour la protéine de capsid (CP). Les particules de flexivirus se présentent sous la forme de bâtonnets d'environ 500 nm de long constitués de 1400 unités de cette protéine assemblées autour de l'ARN génomique de polarité positive.

Le choix de la ou des protéines étudiées sera dicté par les possibilités de production en système hétérologue (bactérie, levure) d'un échantillon en quantité suffisante et correctement replié. La protéine capsidique (CP – 238 aa) semble être la protéine la plus adaptée pour mener à bien une étude structurale, compte tenu de sa taille et de données existantes pour la protéine homologue d'un autre *Flexiviridae*, le virus de la mosaïque du papayer (PapMV ; Lecours *et al.*, 2006). Cette étude a montré que les 25 premiers acides aminés de cette protéine sont responsables de sa multimerisation, mais qu'une protéine hautement structurée présentant un taux de structures en hélice supérieur à 55% et soluble peut être obtenue après délétion de ces 25 résidus.

### 3.1.3.3. Caractérisation des populations virales des bananiers et plantains

Ces dernières années, l'emploi de techniques de métagénomique a permis d'identifier un très grand nombre de nouvelles espèces virales et d'en mesurer la diversité, principalement dans le milieu marin (Angly *et al.*, 2006 ; Culley & Steward, 2007 ; Bench *et al.*, 2007 ; Desnues *et al.*, 2008). Ces approches n'ont pour le moment pas été appliquées à la caractérisation des populations virales des plantes. Pourtant, la mise en place de programmes similaires chez les plantes pourrait elle aussi nous conduire à accroître de façon importante nos connaissances sur la diversité des populations virales, sur les interactions entre elles et également avec leurs hôtes et sur les risques d'émergence d'espèces existantes ou recombinantes (Wren *et al.*, 2006). De plus, la plupart des virus de plantes se prêtent à des approches de ce type. En effet, les virus de plantes possèdent en majorité un génome ARN, généralement de polarité positive. Leur réplication par les réplicases virales fait donc intervenir des intermédiaires ARN double brin (dsRNA) qui sont spécifiquement viraux et peuvent être purifiés grâce à leur affinité pour la cellulose CF11 (Dodds *et al.*, 1984 ; Tzanetakis *et al.*, 2008). Cette propriété est depuis longtemps utilisée pour générer par reverse transcription reverse des copies ADN complémentaire (cDNA) de certains génomes viraux et les cloner à des fins de séquençage et/ou d'étude de leur fonctionnement. L'utilisation dans l'étape de transcription reverse d'amorces de séquence aléatoire a récemment permis le clonage simultané puis la caractérisation par des approches de métagénomique d'un grand nombre de séquences virales présentes dans le milieu marin (Culley & Steward, 2007). Je souhaite mettre en œuvre une approche similaire chez le bananier. Pour cela, les dsRNA de pools de bananiers présentant ou non des symptômes seront purifiés par fixation à la cellulose CF11 selon la technique de Tzanetakis *et al.* (2008). L'amplification de séquences virales à partir de ces dsRNA sera effectuée par reverse transcription et PCR à l'aide d'hexamères de séquence aléatoire (Tzanetakis *et al.*, 2005), d'amorces partiellement dégénérées de type CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP ; Rose *et al.*, 1998) dessinées grâce aux outils spécifiques disponibles sur internet (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>) et/ou d'amorces genre-spécifiques déjà disponibles, comme par exemple des amorces potyvirus-spécifiques (Chen & Adams, 2001) éventuellement optimisées à l'aide de nouveaux outils d'analyse (Zheng *et al.*, 2008).

La caractérisation de nouveaux virus à génome ADN est plus délicate à mettre en œuvre, en raison de l'absence de formes ADN spécifiquement virales utilisables pour amplifier de façon sélective des parties de génomes viraux. La seule approche expérimentale envisageable consiste à purifier les particules virales par une série de centrifugations destinées à éliminer les débris cellulaires et/ou par filtrations successives en flux tangentiel (Aranha-Creado & Fennington, 1997), puis à concentrer de façon classique les particules virales par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium et à amplifier de façon aléatoire des parties des génomes viraux.

Les produits d'amplification seront clonés et séquencés, et les séquences obtenues comparées grâce aux outils classiques de bio informatique (BLASTN, BLASTX) à celles présentes dans les banques de données, notamment celles émanant de travaux similaires éventuellement réalisés sur d'autres plantes. Les séquences identifiées dans des variétés domestiquées seront comparées à celles identifiées dans des variétés sauvages afin d'établir le rôle éventuel de la domestication dans la diversité et l'émergence des populations virales.

Le développement d'approches et d'outils génériques pour la caractérisation de nouvelles populations virales fait partie des activités du programme de recherche sur les maladies émergentes animales et végétales en Guadeloupe que nous souhaitons développer avec l'équipe de l'UMR 1309 INRA-CIRAD "contrôle des maladies animales exotiques et émergentes", dans le cadre du projet opérationnel FEDER (2008-2013) que je coordonne. La caractérisation de nouvelles populations virales des bananiers et plantains pourrait donc être entreprise dans le cadre de l'accueil dans nos deux unités d'un(e) doctorant(e) travaillant conjointement sur un modèle animal et un modèle végétal. Cette thématique s'inscrit également dans le cadre de la collaboration établie entre notre équipe et celle de T. Candresse (UMR GD2P, INRA Bordeaux

Aquitaine), qui bénéficie d'une grande expérience en matière de recherche et de caractérisation de virus de plantes, et d'analyse bio-informatique des données de séquence.

### **3.2. Evaluation et gestion du risque lié à l'activation des EPRV BSV pathogènes**

---

#### **3.2.1. Situation du sujet**

La création de nouvelles variétés de bananiers repose pour l'instant sur des clones naturels sans aucune diversité génétique et vulnérables aux attaques parasitaires contre lesquelles n'existe qu'une lutte chimique. La création de nouvelles variétés apportant notamment des résistances naturelles et durables aux maladies et aux ravageurs est donc une priorité pour l'élaboration de systèmes de culture durables et respectueux de l'environnement. Les variétés de bananiers cultivées aujourd'hui dérivent de deux espèces sauvages originelles, *Musa acuminata* (A) et *Musa balbisiana* (B) (Carreel *et al.*, 2002) : *Musa acuminata* apporte des caractères de diversité et de qualité –notamment organoleptique- des fruits ainsi que des caractères de résistance, notamment aux maladies cryptogamiques et aux nématodes (Miller *et al.*, 2008 ; Peraza-Echevaria *et al.*, 2007); *Musa balbisiana* apporte pour sa part des caractères de vigueur des plantes et de résistance aux stress -notamment hydrique- ainsi que des résistances complémentaires. Les combinaisons de croisements entre ces deux espèces ont conduit à la création d'un certain nombre d'hybrides interspécifiques, en particulier au CIRAD (Jenny *et al.* 2003). L'observation de ces combinaisons interspécifiques a malheureusement conduit à la découverte de séquences pararétrovirales endogènes du *Banana streak virus* (EPRV BSV) pathogènes intégrées au génome *Musa balbisiana* (Iskra-Caruana *et al.*, 2003 ; Lheureux *et al.*, 2003 ; Hohn *et al.*, 2007 ; Gayral *et al.*, 2008). L'expression de ces séquences est activée par certains stress biotiques et abiotiques dont la culture *in vitro* (Dallot *et al.*, 2001 ; Folliot *et al.*, 2005), et génère des particules virales, notamment dans les hybrides interspécifiques de génotype AAB et AAAB. En raison du risque de diffusion du BSV par l'activation d'EPRV BSV pathogènes, le CIRAD a choisi en 2000 d'éliminer une série d'hybrides AAB pourtant prometteuse qu'il avait créée et de cesser d'utiliser *M. balbisiana* dans son programme de création variétale, qui est donc désormais focalisé sur l'obtention d'hybrides intra spécifiques *Musa acuminata*. Parce qu'elle limite la base génétique des croisements, cette stratégie par défaut prive les hybrides obtenus des caractères de vigueur et de qualités mécaniques des fruits apportés par les parents *M. balbisiana*, de même qu'elle fait peser des incertitudes sur la durabilité des résistances aux maladies des hybrides intra spécifiques *M. acuminata*. Elle compromet également un des objectifs de l'Unité, qui consiste à élargir la création variétale à des bananiers plus rustiques et mieux adaptées aux stress abiotiques, notamment la sécheresse.

Face à cette situation, le CIRAD a choisi de développer principalement des programmes de recherche cognitifs sur les EPRV BSV, notamment sur les mécanismes génétiques et moléculaires de leur activation, dans l'espoir de mettre au point des stratégies de lutte contre l'activation. Ces programmes ont participé à l'essor global des connaissances sur les séquences virales endogènes. Connues depuis longtemps dans le règne animal, elles n'ont été découvertes que récemment chez les plantes (pour revue, voir Harper *et al.*, 2002). A ce jour, les séquences virales endogènes des plantes qui ont été caractérisées sont majoritairement d'origine pararétrovirale (EPRV). Des séquences endogènes de gémivirus (*Geminivirus related sequences*, GRD) ont toutefois été décrites dans le génome nucléaire de nicotianées (Murad *et al.*, 2004) et des séquences endogènes de potyvirus dans celui de la vigne (Tanne & Sela, 2005). Cependant, les seuls cas connus de séquences virales endogènes pathogènes susceptibles de générer des particules virales *via* des processus d'activation, sont d'origine pararétrovirale et

concernent le *Tobacco vein clearing virus* (TVCV ; Lockhart *et al.*, 2000), le *Petunia vein clearing virus* (PVCV ; Richert Pöggeler *et al.*, 2003 ; Noreen *et al.*, 2007) et le BSV (Gayral *et al.*, 2008).

Dans le cas des EPRV BSV, un facteur génétique associé à l'expression de la maladie dans des hybrides AAB a été identifié (Lheureux *et al.* 2003). La séquence complète de certains EPRV BSV présents dans le génome *M. balbisiana* a été déterminée (Piffanelli *et al.*, 2005 ; Gayral *et al.*, 2008), dans le cadre d'un projet Agropolis 2 que j'ai coordonné conjointement avec F. Côte. L'analyse de ces séquences a montré que plusieurs EPRV BSV potentiellement pathogènes comportant la totalité du génome viral sous forme de séquences fortement réarrangées et parfois dupliquées sont présents dans le génome nucléaire de *M. balbisiana*. Enfin, une étude exhaustive du comportement en culture *in vitro* de quelques hybrides AAB et AAAB naturels ou créés a montré que les EPRV BSV pathogènes présents dans leur génome s'y comportent de façon identique : ils sont pareillement susceptibles d'activation par la culture *in vitro*, ce qui aboutit à une proportion importante (10 à 20%) de plantes infectées par une ou plusieurs espèces BSV (Folliot *et al.*, 2005). Tous ces résultats, obtenus au CIRAD, ne permettent toutefois pas d'envisager à une échéance raisonnable le développement et la mise en œuvre de stratégies de lutte contre les EPRV BSV pathogènes. Parallèlement, le projet européen *Paradigm* dont M.-L. Caruana et moi-même avons assuré la coordination (voir <http://paradigm.cirad.fr/>) a abouti à des avancées importantes sur les EPRV, notamment la mise en évidence de leur présence dans le génome de nombreuses plantes cultivées dont la tomate, la pomme de terre, le poivron, le tabac ou la betterave sucrière (Hohn *et al.*, 2007). Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des pathosystèmes petunia/ PVCV EPRV, tomate / LycEPRVs et tabac / *Tobacco endogenous pararetrovirus* (TEPV) a pour sa part permis la caractérisation de mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'expression des EPRV (Noreen *et al.*, 2007) et l'accumulation de données expérimentales suggérant l'implication des EPRV non pathogènes dans des mécanismes de protection anti virale (Mette *et al.*, 2002).

Les programmes de recherche cognitive du CIRAD sur le pathosystème *Musa* / EPRV BSV doivent être poursuivis, car ils contribuent à la caractérisation d'interactions génomiques hôtes/pathogènes et de possibles mécanismes développés par les plantes pour contrôler les infections virales (Teycheney & Tepfer, 2007). Cependant, les difficultés inhérentes à l'utilisation du bananier pour tout type d'approche moléculaire ainsi que l'impossibilité de transmettre mécaniquement les virus chez le bananier rendent les progrès difficiles dans le cas du pathosystème bananier / BSV EPRV, pour des raisons techniques qui s'ajoutent à un contexte génétique complexe. La **création de modèles expérimentaux EPRV BSV** chez des plantes herbacées bien caractérisées (nicotianées, arabette) constitue sans doute à cet égard une alternative qu'il convient d'explorer afin d'identifier des gènes de plantes impliqués dans l'activation des EPRV BSV pathogènes. De plus, des recherches ayant pour objectif de trouver des solutions à court ou moyen terme aux problèmes posés par les EPRV BSV pathogènes doivent également et simultanément être entreprises. Ces recherches portent notamment sur l'**évaluation du risque** de diffusion des espèces BSV par la diffusion à grande échelle d'hybrides interspécifiques porteurs d'EPRV BSV pathogènes, la **recherche et la caractérisation de sources naturelles de résistances** à l'expression des EPRV BSV pathogènes et la **création de ressources *M. balbisiana*** utilisables pour la création d'hybrides interspécifiques ne posant pas de risque d'activation d'EPRV BSV pathogènes. Ces quatre axes forment l'ossature du projet de recherche sur les EPRV BSV que j'ai initié et que je souhaite poursuivre.

### 3.2.2. Objectifs du projet

Le BSV est un modèle étudié dans notre équipe. Les travaux visant à évaluer et gérer le risque lié à l'activation des EPRV BSV pathogènes y seront poursuivis et diversifiés :

- La recherche et la caractérisation de gènes de plantes impliqués dans l'activation des EPRV BSV pathogènes seront entreprises. Pour cela, des modèles expérimentaux EPRV BSV seront créés chez des herbacées moins complexes génétiquement, plus accommodantes techniquement que le bananier et pour lesquelles existent des outils permettant la caractérisation de gènes candidats, telles des banques de mutants étiquetés.
- L'évaluation du risque de diffusion des espèces BSV par la diffusion à grande échelle d'hybrides interspécifiques porteurs d'EPRV BSV pathogènes sera entreprise, au moyen de collaborations avec des pays de la zone Caraïbe / Amérique du Sud dans lesquels de tels hybrides ont été largement diffusés et/ou dans le cadre d'un réseau de surveillance des maladies des plantes cultivées dans la Caraïbe.
- La recherche et la caractérisation de sources naturelles de résistances à l'expression des EPRV BSV sera entreprise, en particulier par le criblage en condition d'activation des EPRV d'accessions comportant plus d'une copie du génome *M. balbisiana*.
- Des travaux visant à créer par recombinaison méiotique des ressources génétiques *M. balbisiana* ne posant pas de risques d'activation d'EPRV BSV pathogènes seront entrepris en collaboration avec les généticiens et améliorateurs de l'Unité.

### 3.2.3. Démarche

#### 3.2.3.1. Recherche et caractérisation de gènes de plantes impliqués dans l'activation des EPRV BSV pathogènes.

Les EPRV pathogènes sont majoritairement présents chez des espèces polyploïdes dont la génétique est complexe et n'est pas entièrement caractérisée, notamment chez le bananier. Ces espèces sont souvent récalcitrantes aux études moléculaires, en raison de la difficulté d'extraire leurs acides nucléiques. En conséquence, les études visant à élucider les mécanismes génétiques et moléculaires de l'activation des EPRV pathogènes dans ces espèces sont difficiles à mettre en œuvre. Afin de pallier ces problèmes, nous souhaitons poursuivre la collaboration entamée avec les équipes de M. Tepfer (ICGEB, Italie) et M. Jacquemond (UR407, INRA Montfavet), qui a pour objectif l'identification de gènes de plantes impliqués dans les processus d'activation des EPRV pathogènes, grâce à l'utilisation d'espèces modèles telles *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana* et *Arabidopsis thaliana*.

Notre stratégie consiste à amplifier par PCR longue distance les séquences génomiques de *M. balbisiana* comportant des EPRV potentiellement pathogènes des espèces BSOLV et BSGFV. Pour cela, des amorces séquence-spécifiques seront dessinées, sur la base des séquences nucléotidiques de trois des clones d'une banque BAC de *M. balbisiana* (Safár *et al.*, 2005) comportant ces EPRV et leurs séquences flanquantes (Piffanelli *et al.*, 2005 ; Gayral *et al.*, 2008). Ces séquences ont été obtenues récemment et déposées dans les banques de données (Lescot *et al.*, 2008). Les produits d'amplification obtenus seront clonés et séquencés, puis insérés dans un vecteur binaire afin de transformer ou agro-inoculer *N. tabacum*, *N. benthamiana* et *A. thaliana*. La taille des produits d'amplification attendus (respectivement 29 kbp pour un EPRV BSOLV, 17 et 19 kbp pour deux EPRV BSGFV) augure de difficultés techniques tant au niveau de l'amplification elle-même que du clonage. Cependant, les outils et les techniques existants devraient nous permettre de les surmonter.

Les lignées agro-inoculées ou transformées puis régénérées seront caractérisées par PCR et Southern blot. L'expression des séquences virales dans ces lignées fera pour sa part



l'objet d'une recherche de transcrits (par Northern blot et RT-PCR) et de particules virales (par M-IC-PCR et observation en microscopie électronique). Dans le cas des plantes transformées, le passage en culture *in vitro* permettra de placer les EPRV en conditions optimales d'activation. *N. tabacum*, *N. benthamiana* et *A. thaliana* ne sont pas des hôtes naturels des espèces BSV. Compte tenu de l'impossibilité de transmettre mécaniquement le BSV, il est impossible de savoir *a priori* si les espèces BSV sont capables de s'y répliquer et d'y former des particules virales. Toutefois, les travaux récents des équipes de M. Tepfer et M. Jacquemond montrent que l'intégration d'une copie complète du génome d'un autre badnavirus dans le génome d'espèces végétales non hôtes de ce virus permet la réalisation de toutes les étapes du cycle viral, jusqu'à la synthèse de particules virales. Ces résultats sont particulièrement encourageants pour le développement d'un système expérimental similaire pour les EPRV BSV pathogènes.

La recherche de gènes impliqués dans l'activation ou l'inactivation des EPRV BSV pathogènes sera réalisée par une approche gène candidat à l'aide de mutants dans lesquels ces gènes sont surexprimés ou éteints. Compte tenu des données disponibles sur la régulation de l'expression des EPRV pathogènes (voir 3.2.1.), des mutants de *N. tabacum*, *N. benthamiana* ou *A. thaliana* dans des gènes impliqués dans les mécanismes de régulation transcriptionnelle ou post transcriptionnelle seront prioritairement utilisés. Ils seront agro-inoculés ou, au cas où l'agro-inoculation s'avérerait inefficace, transformés à l'aide des constructions détaillées plus haut. Si des gènes candidats impliqués dans l'expression des EPRV BSV sont identifiés, des orthologues de ces gènes seront recherchés chez le bananier et leur rôle sera confirmé par extinction post transcriptionnelle à l'aide de constructions hairpin les ciblant spécifiquement.

Par ailleurs, la caractérisation en cours dans notre équipe et dans celle d'A. Geering et J. Thomas (QDPI&F, Australie) de séquences de type EPRV chez des variétés et hybrides du genre *Passiflora* pourrait également nous donner accès à un modèle expérimental plus simple que le pathosystème BSV / bananier.

### 3.2.3.2. Evaluation du risque de dissémination des espèces BSV par la diffusion à grande échelle d'hybrides interspécifiques porteurs d'EPRV BSV pathogènes

Les risques potentiels de dissémination du BSV par le déploiement d'hybrides interspécifiques créés de génotype AAB ou AAAB n'ont jamais été évalués à l'échelle de la parcelle. Le risque majeur est celui d'une activation à grande échelle dans ces hybrides des EPRV BSV pathogènes, consécutives à un stress abiotique, par exemple un accroissement de l'amplitude thermique. Une telle situation aboutirait à la présence de foyers primaires qui pourraient servir de réservoir pour la transmission par vecteur à des variétés dessert *M. acuminata*, qui sont largement cultivées pour l'exportation, notamment dans l'arc Caraïbe et en Amérique du Sud. Or, quelques hybrides interspécifiques créés de génotypes AAB ou AAAB ont été largement diffusés dans cette zone géographique, notamment à Cuba et dans une moindre mesure en République Dominicaine. Il est donc possible d'y évaluer les risques réels de dissémination du BSV à partir d'hybrides interspécifiques. A cette fin, des campagnes de notation de symptômes, de récolte d'échantillons foliaires (symptomatiques ou non) entamées à Cuba en collaboration avec l'INISAV seront poursuivies :

- pour des hybrides de génotype AAB ou AAAB dans lesquels la présence de BSV peut résulter d'une activation d'EPRV BSV pathogènes ou d'une transmission par vecteur
- pour des variétés de type dessert de génotype AAA, dans lesquelles elle ne peut résulter que d'une transmission par vecteur

Le typage des espèces BSV présentes dans ces échantillons sera lui aussi poursuivi par M-IC-PCR à l'aide d'amorces souche-spécifique et d'amorces dégénérées, selon la stratégie exposée en 3.1.3.1. La diversité moléculaire des espèces BSV sera comparée dans différentes variétés d'hybrides interspécifiques (FHIA 03, FHIA 18, FHIA 21) ou intra spécifiques *M. acuminata* strict (Grande Naine, FHIA 17, FHIA 23). Les relations phylogéniques entre les

espèces BSV présentes à Cuba et en République Dominicaine avec celles présentes en Afrique, aux Antilles et en Australie pour lesquelles des données de séquence équivalentes sont déjà disponibles permettront de déterminer s'il existe ou non une spéciation géographique des espèces et/ou une spécificité des espèces présentes selon le génotype, notamment pour les variétés hybrides, en fonction des EPRV BSV présents dans le génome *M. balbisiana*. Ce travail sera effectué par E. Javer-Higginson dans le cadre de sa thèse de Doctorat (voir 3.1.3.1.).

La dynamique des populations de cochenilles vectrices des espèces BSV n'a jamais fait l'objet d'études approfondies. Toutefois, la progression assez lente des foyers d'infection généralement observée laisse supposer que les cochenilles se déplacent lentement. La très récente mise au point d'un test d'identification par multiplex PCR de trois espèces de cochenilles (Saccaggi *et al.*, 2008), dont deux (*P. citri* et *P. ficus*) sont vectrices des espèces BSV, pourrait nous permettre d'aborder l'étude de la vection et de l'étiologie des espèces BSV en Guadeloupe.

Pour cela, il nous faudra mettre au point une technique de détection des espèces BSV dans les espèces cochenilles vectrices, comme cela a été fait pour d'autres virus de plantes transmis par des pucerons (Saponari *et al.*, 2008 ; Vigano & Stevens, 2007). Une étude de ce type nous permettra de comprendre si le faible taux de prévalence des espèces BSV observé sur banane dessert en Guadeloupe (Péréfarres *et al.*, 2007) résulte ou non d'un faible niveau d'infestation par les populations de cochenilles vectrices. Dans un deuxième temps, en fonction des compétences mobilisables, une analyse similaire sera conduite à Cuba et en République Dominicaine afin de compléter les études de diversité des populations de BSV qui y seront entreprises (voir 3.1.3.1) et de comparer les situations épidémiologiques de ces pays avec celle de la Guadeloupe.

En l'absence dans l'équipe et plus généralement en Guadeloupe de compétences dans les domaines de l'entomologie et de la dynamique des populations de vecteurs des maladies vectorielles, il nous sera difficile d'aborder de façon exhaustive ce volet pourtant capital pour évaluer le risque de dissémination du BSV, à moins d'un renforcement de l'équipe dans ces domaines. Dans un premier temps, nous espérons que l'équipe sera renforcée dès 2009 par l'accueil d'un entomologiste pendant 9 mois, si le projet européen *Guademerged* (7<sup>e</sup> PCRD) est accepté pour financement. Ce projet vise à renforcer le potentiel de recherche du CIRAD Guadeloupe sur les maladies émergentes et vectorielles. T. Lefrançois et moi-même l'avons déposé en mars 2008. Il s'inscrit dans notre stratégie de développement d'approches communes avec nos collègues du CIRAD Guadeloupe spécialistes en santé vétérinaire, dans l'objectif de développer en Guadeloupe un pôle de recherche sur les maladies infectieuses et vectorielles à l'échelle de la Caraïbe.

L'ensemble de cette activité s'inscrit également dans le cadre d'une initiative régionale visant à établir un réseau de surveillance et de contrôle des maladies et ravageurs des plantes cultivées à l'échelle de la Caraïbe. Cette initiative résulte des efforts conjoints d'institutions régionales (IICA : *Inter-American Institute for Cooperation in Agriculture*, CARDI : *Caribbean Agricultural Research and Development Institute*, CABI : *Commonwealth Agricultural Bureaux International* et CIRAD), de la Communauté du bassin des Caraïbes (CARICOM) et de l'USDA (United States Department of Agriculture). Plusieurs groupes de travail ont été créés, dont un sur le BSV que je coordonne.

### 3.2.3.3. Recherche et caractérisation de sources naturelles de résistance à l'expression des EPRV BSV pathogènes

Des données préliminaires font état dans les variétés de *Musa* comportant deux copies du génome *M. balbisiana* d'une résistance à l'activation d'EPRV BSV infectieux et à l'infection exogène par l'espèce BSOLV (Iskra Caruana, comm. pers.). Des travaux réalisés sur d'autres espèces végétales, dont l'espèce modèle *A. thaliana*, ont montré que dans les variétés allopolyploïdes, les mécanismes d'expression génique sont modifiés (pour revue, voir Adams, 2007; Wang *et al.*, 2007). En particulier, la polyploïdie modifie la méthylation (Salmon *et al.*, 2005; Madlung *et al.*, 2005; Lukens *et al.*, 2006) et la structure chromatinienne (Adams, 2007), qui sont précisément impliquées dans les processus d'extinction génique et de contrôle de l'expression des EPRV (Noreen *et al.*, 2007; Staginnus *et al.*, 2007). Il est donc possible que le niveau de ploïdie du génome *M. balbisiana* influence directement l'expression des EPRV BSV pathogènes et le contrôle des mécanismes de défense antivirale basés sur l'extinction transcriptionnelle et/ou post transcriptionnelle, comme cela a été proposé pour expliquer le maintien au cours de l'évolution de séquences pararétrovirales dans le génome des plantes (Hull *et al.*, 2000; Mette *et al.*, 2002; Geering *et al.*, 2005; Noreen *et al.*, 2007).

Afin d'étayer nos données préliminaires, une évaluation du potentiel d'activation des EPRV BSV pathogènes dans des accessions ou hybrides comportant plus d'une copie du génome *M. balbisiana* est en cours. Ces travaux ont été initiés dans notre équipe et sous mon encadrement par R. Rezé, dans le cadre de son stage de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'Université Culture de Tissus et de Cellules et Biologie Moléculaire (IUT de Dijon). Ils font appel à la culture *in vitro*, qui est à ce jour la technique la plus efficace pour activer l'expression des EPRV pathogènes. Les rejets d'accessions de génotypes AB, BB, ABB et AABB naturelles, obtenues préalablement après doublement du stock chromosomique par traitement à la colchicine ou par autofécondation, ont été sélectionnés, de même que des rejets d'une accession de génotype AAB qui serviront de contrôles positifs d'activation, et des rejets d'une accession de génotype AAA qui serviront de contrôles négatifs. L'ensemble des rejets sélectionnés a été indexé pour la présence de tous les virus infectant les espèces *Musa*, en particulier les principales espèces BSV. Les apex provenant des rejets indexés indemnes de particules virales ont été prélevés, mis en culture *in vitro* et micropropagés. Pour chacune des accessions, une cinétique d'expression des EPRV BSV sera réalisée au cours des étapes de multiplication et de régénération. Pour cela, une cinquantaine de touffes de régénération sera indexée par M-IC-PCR pour les principales espèces BSV (BSGFV, BSOLV, BSMysV et BSI<sub>m</sub>V) à chaque cycle de repiquage et pour chacune des accessions, pendant un minimum de 8 cycles. Ce suivi sera poursuivi sous serre après sevrage des plants.

Ces travaux nous permettront dans un premier temps de déterminer l'effet de la ploïdie du génome B sur la capacité à être activée des EPRV BSV pathogènes. Le cas échéant, ils nous fourniront des données utilisables pour la réintégration du génome *M. balbisiana* dans nos schémas de création variétale, notamment dans le cadre de la création d'hybrides de génotype ABB. Ils aboutiront également à la création de matériel biologique utilisable pour caractériser les mécanismes moléculaires éventuels impliqués dans la résistance au BSV.

#### 3.2.3.4 Création de ressources génétiques *M. balbisiana* ne posant pas de risques d'activation d'EPRV BSV

Les travaux menés au CIRAD ont montré que le génome *Musa* est sujet à des translocations importantes lors de la méiose (Villarinhos *et al.*, 2003). Des données expérimentales obtenues dans notre équipe par Isabelle Acina montrent que des réarrangements chromosomiques sont intervenus dans certains EPRV BSV au cours de la méiose chez des autofécondés ou des haploïdes doublés *M. balbisiana*. Ces réarrangements pourraient influencer sur l'expression des EPRV BSV pathogènes. Ces données confirment celles obtenues par Skalická *et al.* (2005), qui montrent qu'une élimination préférentielle de copies du pararétrovirus endogène NtoEPRV est intervenue au cours de la formation d'allotétraploïdes à partir de parents *Nicotiana glauca* et *N. tomentosiformis*. Il est possible que cette élimination préférentiellement ciblée sur les séquences pararétrovirales apportées par le parent paternel (*N. tomentosiformis*) fasse intervenir des réarrangements chromosomiques résultant eux-mêmes d'évènements de recombinaison et/ou de transposition du rétrotransposon *Ty3-gypsy* (*Metaviridae*) qui est associé aux NtoEPRV présents dans le génome de *N. tomentosiformis* (Gregor *et al.*, 2004; Matzke *et al.*, 2004; Skalická *et al.*, 2005). Des travaux réalisés sur d'autres espèces végétales montrent par ailleurs que la polyploïdie peut induire des réarrangements chromosomiques et une perte de séquences géniques (pour revue voir Song *et al.* 1995; Pires *et al.* 2004; Pontes *et al.* 2004; Udall *et al.*, 2005) ainsi que des modifications des mécanismes de régulation épigénétiques (Levy & Feldman 2005 ; voir 3.2.3.3).

En collaboration avec les généticiens et améliorateurs de l'Unité, notamment l'équipe de Christophe Jenny, responsable des activités de création variétale *Musa* dans l'UPR75, nous souhaitons évaluer les possibilités de création de géniteurs *M. balbisiana* améliorés utilisables pour la création d'hybrides *M. acuminata* x *M. balbisiana* car ne présentant pas de risques d'activation d'EPRV BSV pathogènes. Pour cela, nos deux équipes seront renforcées cette année par le recrutement d'un chercheur post doctoral. Il ou elle aura pour mission de créer des géniteurs *M. balbisiana* par androgenèse, autofécondation, doublement du stock chromosomique par traitement à la colchicine ou croisement entre génotypes distincts *M. balbisiana*. Le profil des EPRV BSV de ces géniteurs sera établi par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des principales espèces BSV puis par southern blot afin de sélectionner les géniteurs améliorés dans lesquels des évènements de recombinaison méiotique auront provoqué des modifications structurales des EPRV BSV. Les géniteurs sélectionnés, ainsi qu'un parent sauvage *M. balbisiana* servant de contrôle positif, seront utilisés dans des croisements avec un parent *M. acuminata* afin de créer des populations ségrégeantes de génotype AAB. La présence de particules virales BSV sera recherchée dans la descendance de ces croisements par M-IC-PCR pour les principales espèces BSV.

#### 4. Références bibliographiques

- Aaziz R. & Tepfer M. (1999). Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **80**: 1339-1346.
- Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M, Brunt AA, Candresse T, Foster GD, Martelli GP, Milne RG, Zavriev SK, Fauquet CM. (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol.* **149**: 1045-60.
- Adams KL. (2007). Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *J Hered.* **98**: 136-41.
- Alves-Rodrigues I., Pedro Galão R., Meyerhans A., Díez J. (2005). *Saccharomyces cerevisiae*: a useful model host to study fundamental biology of viral replication. *Virus Res.* **120**: 49-56.
- Anderson P.K, Cunningham A.A., Patel N.G., Morales F.J., Epstein P.R., Saszak P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* **19**: 535- 544.
- Angly F, Felts B, Breitbart M, Salamon P, Edwards R, Carlson C, Chan AM, Haynes M, Kelley S, Liu H, Mahaffy JM, Mueller JE, Nulton J, Olson R, Parsons R, Rayhawk S, Suttle CA, Rohwer F. (2006) The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biol* **4** (11): e368.
- Aranha-Creado H, and Fennington GJ Jr (1997). Cumulative viral titer reduction demonstrated by sequential challenge of a tangential flow membrane filtration system and a direct flow pleated filter cartridge. *PDA J Pharm Sci Technol* **51**: 208-212.
- Astier S., Albouy J., Maury Y., Lecoq H. (1997). Principes de virologie végétale. Editions INRA.
- Atreya PL, Atreya CD, Pirone TP. (1991). Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 7887-91
- Australian Quarantine and Inspection Service (1990). Peanut stripe virus. *Plant Quarantine leaflet* No 65, 3 pp.
- Beckham CJ, Light HR, Nissan TA, Ahlquist P, Parker R, Noueiry A. (2007). Interactions between *Brome mosaic virus* RNAs and cytoplasmic processing bodies. *J Virol.* **81**: 9759-68.
- Bench SR, Hanson TE, Williamson KE, Ghosh D, Radosovich M, Wang K, Wommack KE. (2007). Metagenomic characterization of Chesapeake Bay viroplankton. *Appl Environ Microbiol.* **73**: 7629-41
- Berthomé R., Teycheney P.-Y., Tepfer M. (2000a). Mécanismes de résistance aux virus dans les plantes transgéniques. *Virologie* **4**, 49-60.
- Berthomé R., Teycheney P.-Y., Renou J.P., Okada Y., Tepfer, M. (2000b). Expression of a yeast RNase III gene in transgenic tobacco silences host nitrite reductase. *Plant Molecular Biology* **44**, 53-60.
- Calvert LA, Cuervo MI, Ospina MD, Fauquet CM, Ramirez BC (1996). Characterization of *Cassava common mosaic virus* and a defective RNA species. *J. Gen. Virol.* **77**: 525-530.
- Candresse T., Macquaire G., Lanneau M., Boussalem M., Quiot-Douine L., Quiot J.B., Dunez J. (1995). Analysis of plum pox virus variability and development of strain-specific PCR assays. *Acta Horticulturae* **386**, 357-365.
- Candresse T., Cambra M., Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorrids T., Revers F., Macquaire G., Olmos A., Boscia D., Quiot J.B., Dunez J. (1998). Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox virus. *Phytopath.* **88**, 198-204.
- Carreel F., Gonzalez de Leon D., Lagoda P., Lanaud C., Jenny Ch., Horry JP., Tézenas du Montcel H. (2002). Ascertaining maternal and paternal lineage within *Musa* by chloroplast and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Genome* **45** : 679:692
- Cassidy B., Sherwood J.L., Nelson R. (1993). Cloning of the CP gene from a blotch strain of *Peanut stripe virus*. *Arch. Virol.* **128**, 287-287.
- Chen J, Adams MJ (2001). A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Arch Virol* **146**: 757–766.
- Culley A.I. and Steward G. (2007). New genera of RNA viruses in subtropical seawater, inferred from polymerase gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **73** : 5937-5944.
- Dallot S., Rivera C., Ramirez P., Côte F., Lockhart B., Caruana M.L. (2001). Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa AAAB*). *Arch Virol* **146**: 2179 - 2190.
- Desnues C, Rodriguez-Brito B, Rayhawk S, Kelley S, Tran T, Haynes M, Liu H, Furlan M, Wegley L, Chau B, Ruan Y, Hall D, Angly FE, Edwards RA, Li L, Thurber RV, Reid RP, Siefert J, Souza V, Valentine DL, Swan BK, Breitbart M, Rohwer F. (2008). Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites. *Nature* **452** :340-3.
- Dietzgen R.G., Teycheney P.Y., Birch R.G., Livingstone M., Budiarto (1993). Molecular cloning of *Peanut stripe potyvirus* coat protein gene and progress in marker gene transfer and peanut regeneration, *ACIAR food legume newsletter* **18**, 11-12.
- Dietzgen R.G., Xu Z., Teycheney P.Y. (1994). Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease* **78**, 708-711.
- Dietzgen R.G., Higgins C.M., Hall R.M., LaBrie P., Teycheney P.Y. Birch R.G. (1999). Immunity to *Peanut stripe virus* infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* and peanut. *Proc. 11th International Congress of Virology*, Sydney 9-13 aout 1999 : 164.
- Dinant, S., Maisonneuve, B., Albouy, J., Chupeau, Y., Chupeau, M. C., Bellec, Y., Gaudefroy, F., Kusiak, C., Souche, S., Robaglia, C., Lot, H. (1997). Coat protein gene-mediated protection in *Lactuca sativa* against *Lettuce mosaic potyvirus* strains. *Molecular Breeding* **3**; 75-86.
- Dodds J A, Morris T J, Jordan R L (1984). Plant viral double stranded RNA. *Ann Rev Phytopathol* **22**: 151-168.
- Dougherty W.G., Lindbo J.A., Smith H.A., Parks T.D., Swaney S., Proebsting W.M. (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants : exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *EMBO J.* **13**, 1482-1491.
- Fargette D., Konaté G., Fauquet C., Muller E., Peterschmitt M., Thresj J.M. (2006). Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Ann. Rev. Phytopath.* **44**: 235-260.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (2005). Virus taxonomy: 8<sup>th</sup> report of the International Committee of the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentil P., Dulucq M.-J., Marais A., Candresse T. (2005). Polyvalent degenerate oligonucleotide reverse transcription-polymerase chain reaction: a polyvalent detection and characterization tool for trichoviruses, capilloviruses and foveaviruses. *Phytopathology* **95**: 617-625.
- Folliot M, Galzi S, Laboureau N, Caruana ML, Teycheney P.-Y., Côte F (2005). Risk assessment of spreading *Banana streak virus* (BSV) through in vitro culture. Abst. 12th International congress of virology, San Francisco, Etats-Unis.

- Fuchs M, Gonsalves D. (2007). Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu Rev Phytopathol.* **45**:173-202.
- Gambley, C. F. & Thomas, J. E. (2001). Molecular characterization of *Banana mild mosaic virus*, a new filamentous virus in *Musa* spp. *Arch Virol* **146**: 1369-1379.
- Gayral P, Noa-Carrazana JC, Lescot M, Lheureux F, Lockhart BE, Matsumoto T, Piffanelli P, Iskra-Caruana ML. (2008). A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus (EPRV). *J Virol.*(sous presse).
- Geering AD, Olszewski NE, Harper G, Lockhart BE, Hull R, Thomas JE (2005). Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. *J Gen Virol* **86**: 511-520
- Glasa M, Palkovics L, Kominek P, Labonne G, Pittnerova S, Kudela O, Candresse T, Subr Z. (2004). Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *J. Gen. Virol.* **85**: 2671-81.
- Greene A.E., Allison R.F. (1994). Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science*, **263**, 1423-1425.
- Gregor W, Mette MF, Staginnus C, Matzke MA, Matzke AJ (2004). A distinct endogenous pararetrovirus family in *Nicotiana tomentosiformis*, a diploid progenitor of polyploid tobacco. *Plant Physiol* **134**: 1191-1199.
- Guo H.S., Cervera M.T. Garcia J.A. (1998). Plum pox potyvirus resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different numbers of plant generations. *Gene* **206**, 263-272.
- Harper G, Osuji JO, Heslop-Harrison P., Hull R. (1999). Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: molecular evidence. *Virology* **255** : 207-213.
- Harper G, Hull R, Lockhart B, Olszewski N (2002). Viral sequences integrated into plant genomes. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 119-136.
- Harper, G., Hart, D., Moul, S., Hull, R., Geering, A., Thomas, J. (2005). The diversity of *Banana streak virus* isolates in Uganda. *Arch. Virol.* **150**: 2407-2420.
- Higgins C.M., Cassidy B.G., Teycheney P.-Y., Wongkaew S, Dietzgen R.G. (1998). Sequences of the coat protein gene of five peanut stripe virus (PSTV) strains from Thailand and their evolutionary relationship with other bean common mosaic virus sequences. *Arch. Virol* **143**, 1655-1667.
- Higgins CM, Hall RM, Mitter N, Cruickshank A, Dietzgen RG. (2004). Peanut stripe potyvirus resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants carrying viral coat protein gene sequences. *Transgenic Res.* **13**: 59-67
- Hily JM, Scorza R, Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M. (2004). Stability of gene silencing-based resistance to *Plum pox virus* in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Res.* **13**: 427-36.
- Hily JM, Scorza R, Webb K, Ravelonandro M. (2005). Accumulation of the long class of siRNA is associated with resistance to *Plum pox virus* in a transgenic woody perennial plum tree. *Mol Plant Microbe Interact.* **18**: 794-9.
- Hirai K, Kubota K, Mochizuki T, Tsuda S, Meshi T. (2008). Antiviral RNA silencing is restricted to the marginal region of the dark green tissue in the mosaic leaves of tomato mosaic virus-infected tobacco plants. *J Virol.* **82**: 3250-60.
- Hohn T., Richert-Pöggeler K., Staginnus C., Harper G., Schwartzacher T., Teo C.-H., Teycheney P.-Y., Iskra-Caruana M.-L., Hull R. (2007). Evolution of integrated plant viruses. M. Roossinck ed., Springer.
- Hull R, Harper G, Lockhart B (2000). Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends Pl. Sci.* **5**:362-365.
- Hull R. (2002). Matthews' plant virology. Academic Press.
- Inokuchi Y, Hirashima A. (1990). Interference with viral infection by RNA replicase deleted at the carboxy-terminal region. *J Biochem.* **108**: 53-8.
- Iskra-Caruana M.-L., Lheureux F., Teycheney, P.-Y. (2003). Les *Pararétrovirus* endogènes (EPRV), voie nouvelle de transmission des virus de plantes. *Virologie* **7**: 255-265.
- Jacquemond M, Teycheney P.-Y., Carrère I., Navas-Castillo J., Anselem J., Tepfer, M. (2001). Resistance phenotypes of transgenic tobacco plants expressing different *Cucumber mosaic virus* (CMV) coat protein genes. *Mol. Breeding* **8**, 85-94.
- Jacquet C., Ravelonandro M., Bachelier J.C., Dunez J. (1998). Use of modified *Plum pox virus* coat protein genes developed to limit heteroencapsulation risks in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **79**, 1509-1517.
- Janda M., Ahlquist P. (1993). RNA dependent replication, transcription, and persistence of *Brome mosaic virus* RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell*, **72**, 961-970.
- Jauffeally-Fakim, Y, Khorugdharry, A., Harper, G. (2005). Genetic variants of *Banana streak virus* in Mauritius. *Virus Res.* **115**: 91-98.
- Jenny C., Tomekpé K., Bakry F., Escalant J.V. (2003). Conventional breeding of bananas. In *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases held in San José, Costa Rica on 20-23 May 2002. INIBAP Montpellier France.
- Jones D.R. (2000). Diseases of banana, abacá and enset. CABI Publishing, Wallingford, U.K, pp 241-293.
- Koonin EV (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **72**: 2197-2206.
- Kundu JK, Briard P, Hily JM, Ravelonandro, M, Scorza R. (2008). Role of the 25-26 nt siRNA in the resistance of transgenic *Prunus domestica* graft inoculated with *Plum pox virus*. *Virus Genes* **36**: 215-220
- Kushner DB, Lindenbach BD, Grdzelskii VZ, Noueiry AO, Paul SM, Ahlquist P. (2003). Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 15764-9.
- Le L. Q., Lorenz Y., Scheurer S., Fotisch K., Enrique E., Bartra J., Biemelt S., Vieths S., Sonnewald U. (2006). Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnol. J.* **4**:231-242.
- Lecours, K., Tremblay, M.H., Gagné, M.E., Gagné, S.M., Leclerc, D. (2006) Purification and biochemical characterization of a monomeric form of *Papaya mosaic potexvirus* coat protein. *Protein Expr Purif.* **47** : 273-80.
- Lescot M, Piffanelli P, Ciampi AY, Ruiz M, Blanc G, Leebens-Mack J, da Silva FR, Santos CM, D'Hont A, Garsmeur O, Vilarinhos AD, Kanamori H, Matsumoto T, Ronning CM, Cheung F, Haas BJ, Althoff R, Arbogast T, Hine E, Pappas GJ Jr, Sasaki T, Souza MT Jr, Miller RN, Glaszmann JC, Town CD. (2008). Insights into the *Musa* genome: syntenic relationships to rice and between *Musa* species. *BMC Genomics* **9**: 58.
- Le Provost G., Iskra-Caruana M.-L., Acina I., Teycheney, P.-Y. (2006). Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. *J. Virol. Meth.* **137**: 7-13.
- Levy AA & Feldman M. (2005). Allopolyploidy--a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet Genome Res.* **109**: 250-8.

- Lheureux F, Carreel F, Jenny C, Lockhart BE, Iskra-Caruana ML (2003). Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific *Musa* hybrids. *Theor Appl Genet* **106**: 594-598.
- Livingstone M.D. & Birch R. G. (1999). Efficient transformation and regeneration of diverse cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by particle bombardment into embryonic callus produced from mature seeds. *Mol. Breeding* **5**: 43-51.
- Lindbo J.A. & Dougherty W. G. (1992). Untranslatable transcripts of the *Tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**: 725-733.
- Lockhart BE, Menke J, Dahal G, Olszewski NE. (2000). Characterization and genomic analysis of tobacco vein clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J Gen Virol* **81**: 1579-85.
- Lukens LN, Pires JC, Leon E, Vogelzang R, Oslach L, Osborn T. (2006). Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiol.* **140**:336–348.
- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L. (2005). Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids. *Plant Physiol.* **129**:733–746.
- Matzke M, Gregor W, Mette MF, Aufsatz W, Kanno T, Jakowitsch J, Matzke AJM (2004). Endogenous pararetroviruses of allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its diploid progenitors, *N.sylvestris* and *N.tomentosiformis*. *Biol. J. Linnean Soc.***82**: 627-638.
- Mette MF, Kanno T, Aufsatz W, Jakowitsch J, van der WJ, Matzke MA, Matzke AJ (2002). Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. *EMBO J* **21**: 461-469
- Metzlaff M., O'Dell M., Cluster P.D., Flavell, R.B. (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in *Petunia*. *Cell* **88**, 845-854.
- Miller RN, Bertioli DJ, Baurens FC, Santos CM, Alves PC, Martins NF, Togawa RC, Souza MT Jr, Pappas GJ Jr. (2008). Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biol.* **30**: 8-15.
- Mishra A., Goehl V.R., Valand G.B., Patel J.G. Shukla D.D. (1993). *Peanut stripe virus* disease of groundnut - a review. *Int. J. Pest Manag.*, **39**, 210-215.
- Morozov, S.Y. & Solovyev A.G. (2003) Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol.* **84** : 1351-66.
- Murad L, Bielawski JP, Matyasek R, Kovarik A, Nichols RA, Leitch AR, Lichtenstein CP. (2004). The origin and evolution of geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana*. *Heredity* **92**: 352-8
- Murphy J.F., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. (1995). Virus taxonomy. *Sixth Report of the International Committee on taxonomy of viruses*. New York: Springer Verlag.
- Ndowora T., LaFleur D., Harper G., Hull R., Olzsewski N., Lockhart B. (1999). Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* **255**: 214-220.
- Nei M. & Gojobori T. (1986). Simple methods for estimating the number of synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**: 418-423.
- Noreen F., Abkergerov, R., Hohn, T. Richert-Pöggeler, K. (2007). Distinct expression of endogenous *Petunia vein clearing virus* and the DANN transposon *dTph1* in two *Petunia hybrida* lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production. *Plant J.* **50**: 219-229.
- Peraza-Echeverria S, James-Kay A, Canto-Canché B, Castillo-Castro E. (2007). Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana. *Mol Genet Genomics.* **278**: 443-53
- Piffanelli P., NoaCarranza J.-C., Benabdelmouna A., Matsumoto T., Silva-Rosales L., Lheureux F., Teycheney P.-Y., Geering A. D., D'Hont A., Frison E., Roux N., Glaszmann J.-C., Sasaki T., Caruana M.-L. (2004). Molecular analysis of *Banana Streak Virus* (BSV) "integrants" into the nuclear genome of *Musa balbisiana*. Abst. International Congress on Banana : harnessing research to improve livelihoods, Penang, Malaisie.
- Pires C, Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Boyd A, Leitch AR, Leitch IJ, Bennett MD, Soltis PS, Soltis DE. (2004). Genome size and distribution of tandem repetitive DNA in allopolyploid *Tragopogon* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **91**: 1022–1035.
- Pontes O, Neves N, Silva M, Lewis MS, Madlung A, Comai L, Viegas W, Pikaard CS. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid Arabidopsis suecica genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 18240-5.
- Powell Abel P., Nelson R.S., Barun De B., Hoffman , Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N. (1986). Delay in disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science* **232**: 738-743.
- Quadt R., Ishikawa M., Janda M., Ahlquist P. (1995). Formation of brome mosaic virus RNA-dependant RNA polymerase in yeast requires coexpression of viral proteins and viral RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 4892-4896.
- Ravelonandro M., Teycheney P.Y., Taver G., Wetzel T., Monsion M., Delbos R.P., Dunez J. (1990). Genomic organization of *Plum pox virus* and recombinant DNA technology to combat plum pox virus, *Acta Horticulturae*, **283**, 295-304.
- Ravelonandro M., Monsion M., Teycheney P.Y., Delbos R., Dunez J. (1992a). Construction of a chimeric viral gene expressing *Plum pox virus* coat protein. *Gene* **21**, 167-173
- Ravelonandro M., Monsion M., Teycheney P.Y., Delbos R.P., Dunez J. (1992b). Transgenic tobacco plants that contain the *Plum pox virus* (PPV) coat protein. *Acta Horticulturae* **309**, 191-196.
- Ravelonandro M., Monsion M., Delbos R.P., Dunez J. (1993). Variable resistance to *Plum pox virus* and *Potato virus Y* infection in transgenic *Nicotiana* plants expressing *Plum pox virus* coat protein. *Plant Sci.*, **91**, 157-169.
- Revers F., Le Gall O., Candresse T., Le Romancer M., Dunez J. (1996). Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *J. Gen. Virol.***77**, 1953-1965.
- Restrepo-Hartwig M. & Ahlquist P. (1999). *Brome mosaic virus* RNA replication proteins 1a and 2a colocalize and 1a independently localizes on the yeast endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **73**, 10303-10309.
- Richert-Pöggeler KR, Noreen F, Schwarzacher T, Harper G, Hohn T. (2003). Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. *EMBO J.* **22**: 4836-45.
- Riechmann J.L., Lain S., Garcia J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* **71**: 1-16.
- Rommens C. M., Humara J. M., Ye J, Yan H., Richael C., Zhang L., Perry R. Swords K. (2004). Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiol.* **135** : 421-431
- Rose, T. M., E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrovski, C. M. McCallum, Henikoff S.. (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* **26**:1628-1635.

- Saccaggi DL, Krüger K, Pietersen G. (2008). A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bull Entomol Res.* **98**: 27-33
- Safár J, Noa-Carrazana JC, Vrána J, Bartos J, Alkhimova O, Sabau X, Simková H, Lheureux F, Caruana ML, Dolezel J, Piffanelli P. (2004). Creation of a BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musa balbisiana*) genome. *Genome* **47**: 1182-91.
- Salánki K., Carrère I., Jacquemond M., Balázs E., Tepfer M. (1997). Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *Journal of Virology* **71**: 3597-3602.
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF. (2005). Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol Ecol.* **14**:1163–1175.
- Sanford J.C. & Johnson S.A. (1985). The concept of pathogen derived resistance : deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* **113**, 395-405.
- Saponari M, Manjunath K, Yokomi RK. (2008). Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *J Virol Meth.* **147**: 43-53.
- Scorza R, Callahan A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Ravelonandro M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in *Plum pox virus* resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res.* **10**: 201-9.
- Senda M, Masuta C, Ohnishi S, Goto K, Kasai A, Sano T, Hong JS, MacFarlane S. (2004). Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes. *Plant Cell* **16**: 807-18.
- Sharman M, Thomas JE, Skabo S, Holton TA. (2008). *Abacá bunchy top virus*, a new member of the genus Babuvirus (family *Nanoviridae*). *Arch Virol.* **153**: 135-47.
- Skalická K., Lim K.Y., Matyasek R., Matzke M., Leitch A.R., Kovarik A. (2005). Preferential elimination of repeated DNA sequences from the paternal *Nicotiana tomentosiformis* genome donor of a synthetic, allotetraploid tobacco. *New Phytol.* **166**: 291–303.
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC. (1995). Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**: 7719–7723.
- Staginnus C & Richert-Pöggeler KR (2006). Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. *Trends Plant Sci* **11**: 485-491.
- Staginnus C, Gregor W, Mette MF, Teo CH, Borroto-Fernández EG, Machado ML, Matzke M, Schwarzacher T. (2007). Endogenous pararetroviral sequences in tomato (*Solanum lycopersicum*) and related species. *BMC Plant Biol.* **21**:7:24.
- Szász A., Szilassy D., Salánki K., Fári M., Balázs E. (1998). A simple and efficient method for the transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Agronomica Hungarica* **46**: 201-207.
- Tanne E. & Sela I. (2005). Occurrence of a DNA sequence of a non-retro RNA virus in a host plant genome and its expression: evidence for recombination between viral and host RNAs. *Virology* **332**: 614-22.
- Teycheney P.Y., Taver G., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez J. (1989). The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA (strain D). *Nucl. Acid Res.* **17**, 10115-10116.
- Teycheney P.Y., Monsion M., Delbos R.P., Ravelonandro M., Dunez J. (1991). Obtention de plantes transgéniques exprimant la protéine capsidique du PPV. *Proc. troisièmes rencontres de virologie végétale*, Aussois 14-18 janvier 1991, pp 85.
- Teycheney P.Y. (1992). Le virus de la Sharka : caractérisation du génome et élaboration de stratégies de lutte par transgénèse. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II, 123p.
- Teycheney P.Y. & Dietzgen, R. G. (1994). Cloning and sequence analysis of the coat protein gene of an Australian strain of *Peanut mottle* and an Indonesian "blotch" strain of *Peanut stripe potyviruses*, *Virus Res.* **31**, 235-244.
- Teycheney P.-Y. & Tepfer, M. (1999). Gene flow from virus-resistant transgenic crops to wild relatives or to infecting viruses. *Proceedings BCPC symposium "Gene flow and agriculture"*, pp 191-196
- Teycheney P.-Y. (1999). Plantes et virus : la guerre sans fin. *Biofutur* **189** : 30-33.
- Teycheney P.-Y., Aaziz R., Dinant S., Salánki K., Tourneur C., Balázs E., Jacquemond, M. Tepfer M. (2000). Synthesis of (-) strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *J. Gen. Virol.* **82**: 1239-1243.
- Teycheney P.Y. & Tepfer, M. (2001). Virus-specific spatial differences in the interference with *chs-A* gene silencing in non-transgenic *Petunia*. *J. Gen. Virol.* **82**, 1239-1243.
- Teycheney P.-Y. & Caruana, M.-L. (2002). Bananier : l'ennemi intérieur. *La recherche* **353** : 34-38.
- Teycheney & P.-Y., Tepfer, M. (2002). Interactions spatiales entre infection virale et extinction post-transcriptionnelle chez le pétunia. *Virologie* **6**, 303-304.
- Teycheney P.-Y., Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L., Candresse, T. (2005a). High genetic variability and evidence for plant-to-plant transfer of *Banana Mild Mosaic Virus*. *J. Gen. Virol.* **86**: 3179-3187.
- Teycheney P.-Y., Marais A., Svanella-Dumas L., Candresse, T. (2005b). Molecular characterization of banana virus X (BVX), a novel member of the *Flexiviridae*. *Arch. Virol.* **150**: 1715-1727.
- Teycheney P.-Y., Acina I., Lockhart B. E. L., Candresse T. (2007). Detection of *Banana mild mosaic virus* and Banana virus X by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR). *J. Virol. Meth.* **142** : 41-49.
- Tzanetakis IE, Keller KE, Martin RR. (2005). The use of reverse transcriptase for efficient first- and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. *J Virol Meth.* **124**: 73-7.
- Tzanetakis IE, Martin RR. (2008). A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. *J Virol Meth.* **149**: 167-70.
- Udall JA, Quijada PA, Osborn TC. (2005). Detection of chromosomal rearrangements derived from homologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* **169**: 967-79.
- Viganó F, Stevens M. (2007). Development of a multiplex immunocapture-RT-PCR for simultaneous detection of BMVYV and BChV in plants and single aphids. *J Virol Meth.* **146**: 196-201.
- Vilarinhos, A.D., Piffanelli, P., Lagoda, P., Thibivilliers, S., Sabau, X., Carreel, F., and D'Hont, A. (2003). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1102–1106
- Voinnet O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-59
- Voinnet O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet.* **6**: 206-20.
- Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ. (2004). Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics.* **167**: 1961-73.



- Wetzel, T., Tavert, G., Teycheney, P.Y., Ravelonandro, M., Candresse, T., Dunez, J. (1990). Dot hybridization detection of *Plum pox virus* using 32P-labeled RNA probes representing non-structural viral protein genes, *J. Virol. Meth.* **30**, 161-172
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Delbos R.P., Mazyad H., Aboul-Ata A.E., Dunez J. (1991). Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of *Plum pox potyvirus*. *J. Gen. Virol.* **72**, 1741-1746.
- Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox potyvirus* detection. *J. Virol. Meth.* **39**, 27-37.
- White KA, Bancroft JB, Mackie GA (1991). Defective RNAs of *Clover yellow mosaic virus* encode nonstructural/coat protein fusion products. *Virology* **183**: 479-486.
- White KA, Morris TJ (1999). Defective and defective interfering RNAs of monopartite plus-strand RNA plant viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **239**: 1-17.
- Wren JD, Roossinck MJ, Nelson RS, Scheets K, Palmer MW, Melcher U. (2006). Plant virus biodiversity and ecology. *PLoS Biol* **4**(3): e80
- Yeh TY, Lin YC, Chang YC, Hsu YH, Lin NS (1999). A defective RNA associated with *Bamboo mosaic virus* and the possible common mechanisms for RNA recombination in potexviruses. *Virus Genes* **18**: 121-128.
- Xu Z., Chen K., Zhang Z., Chen, J. (1991). Seed transmission of *Peanut stripe virus* in peanut. *Plant Dis.*, **75**, 723-726.
- Zhao, H. & Arnold, F.H. (1997). Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucl. Acid Res.* **25**: 1307-1308.
- Zheng L, Wayper PJ, Gibbs AJ, Fourment M, Rodoni BC, et al. (2008). Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. *PLoS ONE* **3**(2): e1586. doi:10.1371/journal.pone.0001586

## RESUME

Les travaux de recherche décrits dans ce mémoire ont été réalisés à la station de Pathologie Végétale du centre INRA Bordeaux-Aquitaine d'octobre 1987 à février 1992, dans le cadre de mon DEA et de ma thèse de Doctorat, puis dans celui des postes que j'ai successivement occupés au *Queensland Agricultural Biotechnology Centre* (QABC) du *Queensland Department on Primary Industries* (QDPI) de Brisbane (Australie) de mars 1992 à juin 1995, à l'*Institute of Molecular Plant Sciences* de la Rijksuniversiteit de Leiden (Pays-Bas) d'août 1995 à décembre 1997, au Laboratoire de Biologie Cellulaire du centre INRA de Versailles, de janvier 1998 à mai 2001 et de celui que j'occupe depuis octobre 2001 à la station de Neufchâteau du CIRAD Guadeloupe.

Ces travaux ont porté sur **l'analyse, la fonction et la diversité des génomes viraux chez les plantes** à des fins de **mise au point de stratégies de lutte anti-virale**. Ils ont eu pour objets des virus appartenant à quatre grandes familles de virus (*Potyviridae*, *Bromoviridae*, *Flexiviridae* et *Caulimoviridae*) dont les génomes ont des organisations et des stratégies d'expression différentes.

Dans le cadre de mes activités de recherche, j'ai déterminé la séquence nucléotidique totale ou partielle de l'ARN génomique de trois potyvirus infectant les arbres fruitiers du genre *Prunus* (*Plum pox virus*, PPV) ou l'arachide (*Peanut stripe virus*, PStV et *Peanut mottle virus*, PeMoV), ainsi que celle d'un flexivirus infectant le bananier que nous avons identifié (*Banana virus X*, BVX). Ces travaux avaient pour objectif d'élucider l'organisation du génome de ces virus et d'attribuer, sur la base d'homologies de séquences, des fonctions aux protéines correspondantes. Certaines de ces séquences ont été utilisées pour des études de diversité moléculaire, de même que des séquences partielles d'un autre flexivirus infectant le bananier, le *Banana mild mosaic virus* (BanMMV). Dans ce dernier cas, nos travaux ont montré que les populations virales étudiées présentent des niveaux de diversité moléculaire parmi les plus importants connus chez les virus de plantes, et que cette diversité résulte pour l'essentiel de l'accumulation de mutations synonymes. Une partie de mes travaux de recherche a également porté sur la mise au point d'un système de réplication chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) d'un virus appartenant au genre Bromovirus, l'*Alfalfa mosaic virus* (AMV).

Certaines des séquences nucléotidiques obtenues au cours de mes travaux ont servi à la mise au point d'outils de diagnostic : sondes nucléotidiques pour la détection du PPV ou du PStV par hybridation moléculaire ; amorces oligonucléotidiques pour le diagnostic du PPV, du PStV ou du BVX par des techniques basées sur la PCR. Des techniques de détection immuno-moléculaires des espèces *Banana streak virus* (BSV) et du BanMMV ont par ailleurs été créées ou optimisées afin de les rendre spécifiques, polyvalentes et utilisables pour des diagnostics de routine.

Une partie importante de mes recherches a porté sur la création de lignées transgéniques résistantes à certains des virus auxquels je me suis intéressé. Elles ont également porté sur l'étude des risques liés à l'utilisation des plantes transgéniques exprimant des séquences virales, en particulier les risques de recombinaison entre les transcrits des transgènes et le génome de virus hétérologues. Certains de mes travaux ont également concerné l'étude de la stabilité des modifications phénotypiques basées sur l'extinction post transcriptionnelle de gènes (*post transcriptional gene silencing*, PTGS).

Mes recherches actuelles portent sur l'impact de la diversité des populations virales sur le fonctionnement des génomes viraux et sur l'émergence de maladies, et sur l'évaluation et la gestion des risques liés à l'activation de séquences pararetrovirales endogènes (*endogenous pararetrovirus*, EPRV) de certaines espèces BSV. Elles constituent la base du projet de recherche que je souhaite conduire.

**Mots clés :** virus, plante, génome, diversité, diagnostic, transgénique, émergence, risques.